

**Röntgenstrukturanalyse der R-spezifischen
Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* bei
0.99 Å Auflösung und röntgenkristallographische
Untersuchungen an der D-Aminosäureoxidase
aus *Trigonopsis variabilis***

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jörg Müller

aus Erfurt

Köln 2000

Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Schomburg

Priv. Doz. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

12. Dezember 2000

Meinen Eltern und
meinem Bruder

Die Wahrheit ist zu schlau,
um gefangen zu werden.

Wilhelm Busch

Danksagung

Diese Arbeit wurde von Januar 1997 bis März 2000 bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Ich möchte Jan Abendroth, Karsten Niefind, Gerd Wohlfahrt und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schomburg meinen Dank aussprechen. Sie sorgten für reichlich Inspiration, Motivation und manchen wissenschaftlichen Diskurs.

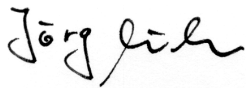
Allen Angestellten des Instituts für Biochemie möchte ich für die immerwährende Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung danken.

Den Kooperationspartnern Bettina Riebel und Werner Hummel aus Jülich sowie Matthias Gabler, Martina Müller und Lutz Fischer aus Braunschweig danke ich für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit innerhalb der durchgeführten Kooperationen.

Desweiteren danke ich Matthias Willmans, Paul Tucker, Alexander Popov und Ehmke Pohl (Hamburg), George Sheldrick und Thomas Schneider (Göttingen), Peter Reinemer (Wuppertal), Talal Gariani (Umeå) sowie den immer hilfsbereiten Lesern des *CCP4-Bulletin Boards*.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg. Er vertraute mir dieses Thema an und gab mir so die Gelegenheit, an einem der spannendsten Bereiche moderner Forschung teilzuhaben. Er war jederzeit zu einem fachlichen Dialog bereit und gab mir viele Anregungen.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

A handwritten signature in black ink, reading 'Jörg Müller'. The signature is written in a cursive style with a large 'J' and a long, flowing 'M'.

Jörg Müller

Inhaltsverzeichnis

Vorspann	I
Danksagung	I
Erklärung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IX
Kurzzusammenfassung/Abstract/Résumé	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Biokatalysatoren	1
1.2 Die R-ADH-Lb	3
1.2.1 Historie und Biochemie der Dehydrogenasen	4
1.2.2 Technische Bedeutung der Dehydrogenasen	5
1.2.3 Die R-ADH-Lb	6
1.2.4 Strukturelle Bedeutung der R-ADH-Lb	7
1.3 Die D-AO-Tv	7
1.3.1 Historie und Biochemie der D-Aminosäureoxidasen	8
1.3.2 Technische Bedeutung der D-Aminosäureoxidasen	10
1.3.3 Die D-AO-Tv	10
1.3.4 Strukturelle Bedeutung der D-AO-Tv	11
1.4 Zielsetzung	13
2 Theoretische Grundlagen	14
2.1 Analytik	14
2.1.1 Massenspektrometrie	14
2.1.2 Dynamische Lichtstreuung	15
2.1.2.1 Grundlagen	15
2.1.2.2 Auswertung	16
2.1.3 CD-Spektroskopie	17
2.1.3.1 Grundlagen	17

2.1.3.2	Auswertung	18
2.1.4	Sekundärbestimmung aus der Proteinsequenz	19
2.2	Proteinröntgenstrukturanalyse	20
2.2.1	Kristallisation von Proteinen	20
2.2.1.1	Kristallisationstechniken	21
2.2.1.2	Suche nach Kristallisationsbedingungen	23
2.2.2	Röntgenkristallographie	24
2.2.2.1	Röntgendiffraktometrie	24
2.2.2.2	Indizierung und Integrierung	25
2.2.2.3	Skalierung	25
2.2.2.4	Packungsdichte und Lösungsmittelgehalt	27
2.2.2.5	Verzwilligung	28
2.2.2.6	Pattersonfunktion	29
2.2.2.7	Selbstrotationsrechnungen	29
2.2.2.8	Molekularer Ersatz	30
	Rotationssuche	31
	Patterson-Korrelationsverfeinerung	31
	Translationssuche	32
2.2.2.9	Strukturverfeinerung	32
	Unterbestimmung	34
	Moleküldynamik	35
	Methoden der kleinsten Fehlerquadrate und der maximalen Wahrscheinlichkeit	35
2.2.3	Hochaufgelöste Proteinstrukturen	37
3	Experimenteller Teil	39
3.1	Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme .	39
3.1.1	Chemikalien und Proteine	39
3.1.2	Materialien, Geräte und EDV-Systeme	39
3.1.3	Programme und Programmpakete	42
3.1.3.1	Das HKL-Paket	42
3.1.3.2	Collaborative Computing Project Number 4 (CCP4)	43
3.1.3.3	EPMR	44

3.1.3.4	X-PLOR und CNS	45
3.1.3.5	REPLACE	46
3.1.3.6	SHELX-97	46
3.1.3.7	Grafikprogramme	46
3.1.3.8	Sonstige Einzelprogramme	47
3.2	Proteinreinigung	48
3.2.1	Chromatographische Verfahren	48
3.2.2	Aufkonzentrierung und Umpufferung	49
3.3	Analytik	50
3.3.1	Aktivitätstests	50
3.3.1.1	R-ADH-Lb	50
3.3.1.2	D-AO-Tv	51
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
3.3.3	Elektrophorese	52
3.3.4	Proteasetest	52
3.3.5	Massenspektrometrie	53
3.3.6	Dynamische Lichtstreuung	54
3.3.7	CD-Spektroskopie	54
3.3.7.1	Messen von CD-Spektren	54
3.3.7.2	Schmelzkurven	55
3.4	Kristallisation	55
3.4.1	Allgemein	55
3.4.2	R-ADH-Lb	56
3.4.3	D-AO-Tv	56
3.4.4	Impfkristallisation	57
3.4.5	Dokumentation der Kristallisation	57
3.5	Röntgendiffraktometrie	58
3.5.1	Kristallmontage	58
3.5.1.1	Röntgenaufnahmen	58
3.6	Reduktion der Rohdaten	59
3.7	Molekularer Ersatz	60
3.7.1	Suchmodelle	60
3.7.2	Kombinierte Rotations- und Translationssuche	60

3.7.3	Rotationssuche	61
3.7.4	Translationssuche	61
3.7.5	Fouriertransformation	62
3.8	Computergrafik	62
3.9	Strukturverfeinerung	63
3.9.1	Verfeinerung mit X-PLOR und CNS	63
3.9.2	Verfeinerung mit CCP4	63
3.9.3	Verfeinerung mit SHELX-97	64
3.9.4	Qualität der Modelle	65
3.10	Proteinmodelling	65
4	Ergebnisse und Diskussion	67
4.1	Die R-ADH-Lb	67
4.1.1	Ausgangsbedingungen	67
4.1.2	Aufreinigung	67
4.1.3	Analytik	69
4.1.3.1	Massenspektren	69
4.1.3.2	Dynamische Lichtstreuung	71
4.1.3.3	CD-Spektren	72
4.1.4	Kristallisation	75
4.1.5	Röntgendiffraktometrie	78
4.1.6	Test auf merohedrische Verzwillingung	84
4.1.7	Untersuchungen der Kristallpackung	84
4.1.8	Rechnungen zum Molekularen Ersatz	85
4.1.8.1	Suche der Modellsequenz	85
4.1.8.2	Kreuzrotationsrechnungen	85
4.1.8.3	Translationsrechnungen	86
4.1.9	Strukturverfeinerung	87
4.1.9.1	Verfeinerung der hochaufgelösten Struktur	90
	Verfeinerung mit CCP4	90
	Verfeinerung mit X-PLOR und CNS	93
	Verfeinerung mit SHELX-97	95

4.1.10	Beschreibung und Diskussion der dreidimensionalen Struktur	97
4.1.10.1	Qualität des Modells und Vergleich der verschiedenen Verfeinerungsstrategien	97
	Modellstatistik	100
	Ramachandran-Diagramm	102
	Luzzati-Diagramm	103
	Temperaturfaktoren und Anisotropie	105
4.1.10.2	Globale Faltung	110
4.1.10.3	Quartärstruktur und Kristallpackung	113
	Kontaktfläche an der P-Achse	115
	Kontaktfläche an der Q-Achse	117
	Kontaktfläche an der R-Achse	118
4.1.10.4	Markante Bereiche in der Struktur	119
	Multiple Konformationen	119
	Flexible Oberflächenschleife	121
	Mg ²⁺ -Bindungsstellen	122
4.1.10.5	Kosubstrat- und Substratbindung	123
	Adenin-Ribose-Teil	125
	Phosphatrückgrat	127
	Nicotinamid-Ribose-Teil	127
	Kosubstratspezifität	128
	Substratbindung	129
4.1.10.6	Reaktionsmechanismus	131
4.1.10.7	Strukturvergleich mit anderen SDR-Proteinen . . .	133
4.1.11	Ausblick	137
4.2	Die D-AO-Tv	139
4.2.1	Ausgangsbedingungen	139
4.2.2	Aufreinigung	139
4.2.3	Analytik	140
4.2.3.1	Massenspektren	140
4.2.3.2	Dynamische Lichtstreuung	141
4.2.3.3	CD-Spektren	142

4.2.4	Kristallisation	146
4.2.5	Röntgendiffraktometrie	149
4.2.6	Bestimmung der Raumgruppe	151
4.2.7	Test auf merohedrische Verzwilligung	152
4.2.8	Untersuchungen der Kristallpackung	153
4.2.9	Rechnungen zum Molekularen Ersatz	154
4.2.9.1	Selbstrotations- und native Pattersonfunktion . . .	154
4.2.9.2	Suche nach der Modellsequenz	156
4.2.9.3	Kreuzrotations- und Translationsrechnungen . . .	156
4.2.10	Strukturmodell der D-AO-Tv	157
4.2.11	Ausblick	163
5	Zusammenfassung	164
A	Anhang	167
A.1	Standardeingabedateien	167
A.1.1	Verfeinerung mit CCP4	167
A.1.2	Verfeinerung mit SHELX-97	173
A.1.3	Eingabedatei für SANDER	176
A.2	Verwendete Internetseiten	178
A.3	Abbildungsverzeichnis	182
A.4	Tabellenverzeichnis	184
A.5	Literaturverzeichnis	186
A.6	Vorabveröffentlichungen	204
A.7	Lebenslauf	205

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Sonstige Abkürzungen

a, b, c	Gittervektoren im realen Raum
a^*, b^*, c^*	Gittervektoren im reziproken Raum
ACP	PDB-Kürzel für Acetophenon
a.i.	absolute Intensität
AS	Aminosäure
au	Asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls oder <i>atomic units</i> in der Massenspektrometrie
B	Faktor für die Quantifizierung des Intensitätsabfalls auf Röntgenbeugungsaufnahmen mit der Auflösung oder Temperaturfaktor
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	Circularer Dichroismus
Cu	Kupfer
d	minimaler gemessener Gitterabstand von Röntgenbeugungsdaten („Auflösung“)
D-AO-Tv	D-Aminosäureoxidase aus <i>Trigonopsis variabilis</i>
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
ε	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>enzyme catalogue</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ESI	Elektrosprayionisation
F ₄₂₀	7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin Derivat
Fa.	Firma
F_c, F_{calc}	berechnete Strukturfaktoramplituden
F_o, F_{obs}	gemessene Strukturfaktoramplituden
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>

g	Gramm
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
I	Intensität
σ_I	Standardabweichung der Intensität, Rauschen
IEF	isoelektrische Fokussierung
l	Liter
λ	Wellenlänge [nm] oder [Å]
LDR	<i>long chain alcohol dehydrogenase</i>
LSQF	<i>least square function</i>
m	Meter
M	molar
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>
MD	Moleküldynamik
MDR	<i>medium chain alcohol dehydrogenase</i>
min	Minute
MLKF	<i>maximum likelihood function</i>
mol	Teilchenzahl (1 mol $\hat{=}$ $6.023 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MQ	doppelt destilliertes steriles Wasser
MS	Massenspektrum
N_a	Avogadro-Zahl ($6.023 \cdot 10^{23}$) [mol ⁻¹]
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEGMME	Polyethylenglykolmonomethylether
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
R-ADH-Lb	R-spezifische Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
R_{cryst}	kristallographischer R-Wert
R_{free}	freier R-Wert

R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
R_{sym}	linearer R-Wert
RMS	Standardabweichung (<i>root mean square</i>)
RSA	Röntgenstrukturanalyse
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDR	<i>short chain alcohol dehydrogenase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
Θ	Elliptizität
$[\Theta]$	spezifische Elliptizität
T_M	Schmelztemperatur
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	ultraviolettes Licht
V_M	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent

Kurzzusammenfassung

Es werden biochemische und röntgenkristallographische Untersuchungen zweier mikrobieller Redoxenzyme beschrieben. Für die R-spezifische Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* konnten mehrere Kristallisationsbedingungen bestimmt werden. Von der innenzentriert orthorhombischen Kristallform mit der Raumgruppe I222 wurden vollständige Röntgendatensätze bis 0.99 Å gemessen. Die 3D-Struktur konnte mittels Molekularem Ersatz mit der 3 α ,20 β -HSD als Suchmodell gelöst werden. Die kristallographischen R-Werte des endverfeinerten Modells betrugen für den R_{work} = 13.4 % und für den R_{free} = 15.3 %. Das Enzym bildet im nativen Zustand ein Homotetramer und bindet ein halbes Mg²⁺-Ion und ein Molekül NADP pro Monomer. Für die D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* wurden eine Reihe von Kristallisationsbedingungen ermittelt. Von einem primitiv tetragonalen Kristall wurde ein vollständiger Röntgendatensatz bis 2.75 Å gemessen. Zur Lösung der 3D-Struktur mittels Molekularem Ersatz wurde aus der Struktur der D-Aminosäureoxidase aus Schweineniere ein Homologiemodell erstellt.

Abstract

Biochemical analysis and X-ray crystallographic investigations of two microbial redox enzymes are described. For the R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* several crystallisation conditions could be identified. From centered orthorhombic crystals in the space group I222 complete X-ray data sets up to 0.99 Å were measured. The 3D-structure was solved by Molecular Replacement with 3 α ,20 β -HSD as search model. The crystallographic R-values of the final model are 13.4 % and 15.3 % for the R_{work} and the R_{free} , respectively. The native enzyme forms a homotetramer and binds half a Mg²⁺-ion and one molecule NADP per monomer. For the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* a set of crystallisation conditions could be determined. From a primitiv tetragonal crystal a complete X-ray data set up to 2.75 Å was collected. For the 3D-structure solution by Molecular Replacement a homology model was created based on the 3D-structure of the D-amino acid oxidase from pig kidney.

Résumé

La thèse décrit une étude biochimique et radio-cristallographique de deux enzymes oxydo-réductrices microbiennes. Nous avons identifié plusieurs conditions de cristallisation pour l'alcool dehydrogénase R-spécifique de *Lactobacillus brevis*. Un cristal orthorhombique centré appartenant au groupe d'espace I222 a permis l'obtention d'un jeu de données complet à 0.99 Å. La structure-3D a été résolue par remplacement moléculaire, utilisant 3 α ,20 β -HSD comme modèle de recherche. Les facteurs d'accord cristallographiques du modèle final se situent à 13.4 % et 15.3 % pour R_{crist} et R_{free} respectivement. L'enzyme est dans son état natif un homo-tétramère et chaque monomère, un demi ion Mg²⁺ et une molécule NADP. Nous avons par ailleurs déterminé plusieurs conditions de cristallisation de l'acide D-aminé oxydase de *Trigonopsis variabilis* et un jeu de données à 2.75 Å de résolution a été enregistré. Afin de résoudre la structure par remplacement moléculaire, un modèle homologue a été créé à partir de la structure tridimensionnelle de l'acide D-aminé oxydase du rein de porc.

1 Einleitung

Die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme gehören zu einer der Unterklassen der Oxidoreduktasen. Oxidoreduktasen sind eine der am weitesten verbreiteten Enzymklassen (EC 1.). Bei den von ihnen katalysierten Redoxreaktionen inkorporieren sie molekularen Sauerstoff in organische Substrate oder dehydrieren diese. Unter den katalysierten Reaktionstypen sind Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Sulfoxidierungen, oxidative Dealkylierungen und Dehydrierungen. Dabei sind die meisten dieser Enzyme, abhängig von der Anwesenheit eines Kosubstrates in der reduzierten oder oxidierten Form, in der Lage die Reaktionen in beiden Richtungen zu katalysieren. In der Regel laufen diese Reaktionen mit hoher Effizienz, Stereo- und Regioselektivität ab.

Die Oxidoreduktasen werden in drei Kategorien eingeteilt (Reid and Fewsion, 1994). Man unterscheidet die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen, die NAD(P)-unabhängigen Dehydrogenasen, Enzyme, die PQQ oder F_{420} als Kosubstrate verwenden, und die FAD-abhängigen Oxidasen.

Die R-spezifische Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (R-ADH-Lb) gehört zur Gruppe der Dehydrogenasen mit NAD oder NADP als Kosubstraten und katalysiert die Oxidation von Ketonen zu sekundären Alkoholen und umgekehrt (EC 1.1.1.). Die D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* (D-AO-Tv) gehört der Gruppe der Oxidasen mit FAD als Kosubstrat, welche die Oxidation von Amino- zu Amidgruppen unter Verwendung von Sauerstoff als Elektronenakzeptor katalysieren (EC 1.4.3.).

Beide Enzyme sind interessant für biotechnologische Anwendungen.

1.1 Biokatalysatoren

In den letzten Jahrzehnten hat die Nutzung von Mikroorganismen und den von ihnen synthetisierten Biomolekülen für den Menschen eine immer größere Bedeutung erlangt.

So kommt Mikroorganismen eine entscheidende Rolle beim Abbau von industri-

ellen Schadstoffen zu, da sie in der Lage sind, neben natürlich vorkommenden auch Xenobiotica – naturfremde Substanzen – abzubauen. Desweiteren finden sie klassischerweise bei der Bier- und Weinproduktion mittels Hefen, der Herstellung von Milchprodukten durch Milchsäurebakterien oder der Produktion von Essig durch Essigsäurebakterien Anwendung.

In der medizinischen Therapie wurde durch die Entdeckung des Penicillins und anderer Sekundärmetabolite aus Pilzen, Actinomyceten und anderen Bakterien eine neue Epoche zur Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten eingeleitet. Diese Anwendungsgebiete der Mikroorganismen werden durch neue Einsatzfelder in der organisch-chemischen Synthese ständig erweitert.

Aus den Mikroorganismen können unter anderem Enzyme gewonnen werden, die mittlerweile als attraktive Katalysatoren in der Synthese organischer Verbindungen gelten (Faber, 1997). Sie sind hoch spezifisch und selektiv und viele Probleme der chemischen Synthese wie Isomerisierung, Racemesierung oder Umlagerungen können durch die milden Reaktionsbedingungen vermieden werden. Besonders für asymmetrische Synthesen weisen enzymatisch geführte Reaktionen beträchtliche Vorteile auf, da die Reaktionen in der Regel streng stereospezifisch verlaufen.

Die Bedeutung der Chiralität der Reaktionsprodukte und die mögliche Wirkungsweise von Enantiomeren wird am Beispiel des Schlafmittels Contergan® deutlich. Enantiomere haben gleiche chemische Eigenschaften, aber eine spiegelbildliche räumliche Struktur. Dadurch können die Antipoden in lebenden Organismen, die ebenfalls chirale Moleküle wie Enzyme oder Rezeptoren enthalten, unterschiedliche Wirkungen erzielen. So hat nur das S-Enantiomer des Thalidomids, dem Wirkstoff des Contergan®, eine teratogene Wirkung (Fruchtschädigung auf Grund zellzerstörender Wirkung) (Böhm et al., 1996).

Neben der organischen Synthese werden Enzyme zur Stärkehydrolyse (Amylasen), zur Lederbearbeitung (Proteasen), als Waschmittelzusatz (Proteasen, Lipasen) oder zur Fruchtsaftklärung (Pektinasen) verwendet. Von den Hauptenzymklassen (Enzyme-Nomenclature, 1979) kommen dabei vor allem Oxidoreduktasen (EC 1.), Hydrolasen (EC 3.) und Lyasen (EC 4.) zum Einsatz.

Zusätzlich zu den oben genannten Vorteilen bieten Enzyme noch eine Reihe weiterer Vorteile gegenüber rein chemischen Verfahren. Sie arbeiten bei Tempera-

turen von 20 bis 100°C, bei neutralem pH-Wert, Atmosphärendruck, in wässriger Lösung und sind umwelt- und ressourcenschonend, da sie weniger Abfall produzieren, weniger Energie und keine nichtregenerierbaren Rohstoffe verbrauchen. Weiterhin ist die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion 10^6 bis 10^{12} mal höher als bei nichtenzymatischen Reaktionen und um mindestens einige Größenordnungen höher als die analoge chemisch katalysierte Reaktion (Voet and Voet, 1992).

Heutzutage können industriell anwendbare Enzyme durch rekombinante Überproduktion kostengünstig in großen Mengen produziert und durch rationales Proteindesign leistungsfähiger gemacht werden. Dies bedeutet die gezielte Veränderung von den oben beschriebenen Charakteristika durch den Austausch von einzelnen Aminosäuren. Ein erfolgreiches Beispiel ist die gezielte Mutagenese der Waschmittelprotease Subtilisin aus *Bacillus subtilis* (Wells, 1987).

Durch die schnell fortschreitende Entwicklung struktureller Methoden können von vielen biotechnologisch und pharmakologisch relevanten Proteinen die 3D-Strukturen gelöst werden. Mit den gewonnenen Strukturinformationen kann das rationale Design von Proteinen erheblich beschleunigt und effektiver gestaltet werden.

Im Bereich der pharmakologischen Anwendung liefern derartige Daten die Möglichkeit des strukturbasierten Designs neuer pharmakologisch wirksamer Substanzen. Ein aktuelles Beispiel ist die Entwicklung eines Inhibitors der HIV-1-Protease (Lange-Savage et al., 1997).

1.2 Die R-ADH-Lb

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Enzym gehört der Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenasen (*short chain dehydrogenases*, SDR) an. Diese Gruppe von Enzymen umfasst mittlerweile ca. 60 Vertreter (Jörnvall et al., 1995) aus der Klasse der Oxidoreduktasen (EC 1.), der Lyasen (EC 4.) und der Isomerasen (EC 5.) (Jörnvall et al., 1995). All diese Enzyme verwenden entweder NAD oder NADP als Kosubstrate. SDR-Proteine setzen ein großes Spektrum organischer Moleküle wie z.B. Alkohole, Zucker, Prostaglandine oder Steroide um und sind

Schlüsselenzyme bei einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen.

1.2.1 Historie und Biochemie der Dehydrogenasen

Dehydrogeasen werden seit der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts intensiv biochemisch untersucht. Erste umfassendere kinetische Daten dieser Enzyme wurde seit 1948 in der Gruppe von Theorell in Stockholm gesammelt (Jeffrey, 1980). Die erste hoch aufgelöste Struktur der Lactatdehydrogenase wurde von Adams et al. (1970) publiziert.

Die Dehydrogenasen werden in drei große Untergruppen eingeteilt. Die zuerst definierte Gruppe waren die *medium chain dehydrogenases* (MDR) (Jörnvall et al. (1987), Persson et al. (1994)), die Untereinheiten von ca. 350 Aminosäuren enthalten und deren katalytische Aktivität häufig von Zn^{2+} -Ionen-abhängig ist (Borras et al. (1989), Persson et al. (1994)). Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die gut untersuchte ADH aus der Pferdeleber (Eklund et al., 1976) und die ADH I aus Hefe (Ganzhorn et al., 1987). Die zweite Gruppe umfasst die in dieser Arbeit untersuchten Metallionen-unabhängigen *short chain dehydrogenases* (SDR) mit kleineren Untereinheiten von ca. 250 Aminosäuren (Jörnvall et al. (1981), Jörnvall et al. (1995)). Die dritte zuletzt klassifizierte Gruppe der *long chain dehydrogenases* (LDR) wird durch Eisenionen aktiviert und hat Untereinheiten von ca. 380 Aminosäuren (Conway et al. (1987), Inoue et al. (1989)).

Die ersten Enzyme der Gruppe der SDR-Proteine wurden in den 70er Jahren analysiert. Dabei konnten zunächst die partielle und später die vollständige Primärstruktur der prokariotischen Ribitoldehydrogenase (Moore et al., 1978) und der ADH aus *Drosophila* (Schwartz and Jörnvall, 1976) aufgeklärt werden. Trotz der signifikanten Unterschiede zu den wohl bekannten Dehydrogenasen aus Hefe und der Leber wurde das Konzept einer eigenen Proteinfamilie der SDR-Proteine erst später etabliert (Jörnvall et al., 1981). Zunächst wurde angenommen, dass es sich um eine Gruppe von rein prokariotischen Enzymen handelte, bis die ersten Säugetierenzyme, die 15-Hydroxyprostaglandindehydrogenase (Krook et al., 1990) und die 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase (Peltoketo et al., 1988), eindeutig den SDR-Proteinen zugeordnet werden konnten. Mit der Aufklärung der 3D-Struktur der $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (Ghosh et al.,

1991) konnten erste fundierte Kenntnisse über das aktive Zentrum und den katalytischen Mechanismus der SDR-Proteine gewonnen werden.

Das Reaktionsschema ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

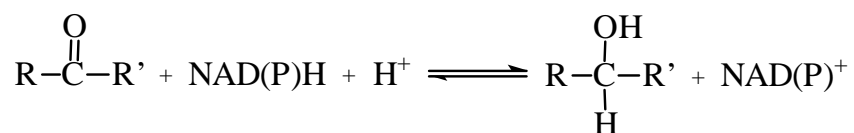


Abbildung 1.1: Reaktionsschema der Alkoholdehydrogenasen. Die Reaktion läuft je nach Lage des Gleichgewichtes in beide Richtungen ab.

Die Reaktion läuft in beiden Richtungen ab, abhängig davon, auf welcher Seite der Reaktionsgleichung ein Überschuss vorliegt. In anabolen Stoffwechselwegen läuft die Reaktion von rechts nach links ab und bei der bakteriellen Fermentation in umgekehrter Richtung, wobei die Bildung des oxidierten Kosubstrates der eigentliche Antriebsfaktor für die Reaktion ist (Clark, 1989).

Der Hydridtransfer verläuft bei den Dehydrogenasen immer streng stereospezifisch, d.h. es werden je nach Enzym in der Oxidation nur R- oder S-Alkohole als Substrate akzeptiert bzw. bei der Reduktion entstehen aus Ketonen nur R- oder S-Alkohole. Dabei können die beiden Reste R und R' in den Substraten eine große Spannbreite bei den verschiedenen SDR-Proteinen einnehmen, wie oben bereits angesprochen wurde.

1.2.2 Technische Bedeutung der Dehydrogenasen

Dehydrogenasen benötigen NAD(P) als Kosubstrate, die teuer sind und die Kosten für organische Synthesen in die Höhe treiben. Dennoch kommt ihnen in den letzten Jahren bei der industriellen Synthese chiraler Verbindungen eine immer größere Bedeutung zu (Hummel, 1997). So wurden für die Synthese von optisch aktiven Hydroxysäuren und Aminosäuren D- oder L-Lactatdehydrogenasen, D- oder L-Hydroxyisocaproinsäuredehydrogenasen und die L-Phenylalanindehydrogenase (Hummel et al. (1984), Hummel et al. (1987)) ein-

gesetzt. Aminosäuren mit ungewöhnlichen Seitenketten wie *S*-*tert*-Leu konnten durch enzymatische reduktive Aminierung der entsprechenden α -Ketosäuren mit der NAD-abhängigen Leucindehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Bommarius et al., 1995) gewonnen werden.

Das häufig breite Substratspektrum wirkt sich in den meisten Fällen positiv aus, da die Enzyme für verschiedenste Synthesen eingesetzt werden können: z.B. werden Dehydrogenasen mittlerweile für Standardsynthesen chiraler Alkohole eingesetzt (Hummel, 1997).

Die Reaktion wird durch die Notwendigkeit der Anwesenheit eines Kosubstrates nicht negativ beeinflusst, da NAD(P) über einen längeren Zeitraum stabil ist (Janssen et al., 1987) und durch Formiat kostengünstig regeneriert werden kann und daher nicht in stöchiometrischen Mengen zugegeben werden muss (Hummel, 1997).

1.2.3 Die R-ADH-Lb

Die in dieser Arbeit untersuchte R-spezifische Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (DSM 20054, EC 1.1.1.2) wurde im Rahmen der Doktorarbeit der Kooperationspartnerin Frau Bettina Riebel vom Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf an der Kernforschungsanlage in Jülich (Arbeitsgruppe von Werner Hummel) entdeckt, kloniert und biochemisch charakterisiert (Riebel, 1996). Das Enzym bildet ein Homotetramer (4×26.6 kDa) mit je 251 Aminosäuren (siehe Abbildung 1.2) pro Untereinheit, akzeptiert als Kosubstrat NADP und zeigt eine Mg^{2+} -Ionenabhängigkeit (Riebel, 1996).

Die R-ADH-Lb kann ein weites Spektrum an Substraten umsetzen. Dabei muss der Rest R (siehe Abbildung 1.1) eine Methylgruppe sein. Der zweite Rest R' kann ein beliebiger aliphatischer oder aromatischer Rest sein (Riebel (1996), Hummel (1997)). Bisher ist kein kompetitiv inhibierendes Substratanalogon bekannt.

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit waren erste Kristallisationsversuche durchgeführt worden, auf deren Ergebnisse in Abschnitt 4.1.4 eingegangen wird.

1	11	21	31	41	51	
1	SNRLDGKVAI	ITGGTLGIGL	AIATKFVEEG	AKVMITGRHS	DVGEKAAKSV	GTPDQIQFFQ 60
61	HDSSDEDGWT	KLFDATEKAF	GPVSTLVNNA	GIAVNKSVEE	TTTAEWRKLL	AVNLDGVFFG 120
121	TRLGIQRMKN	KGLGASIINM	SSIEGFVGGP	SLGAYNASKG	AVRIMSKSAA	LDCALKDYDV 180
181	RVNTVHPGYI	KTPLVDDLPG	AEEAMSQRK	TPMGHIGEPN	DIAYICVYLA	SNESKFATGS 240
241	EFVVDGGYTA	Q				

Abbildung 1.2: Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb, bestimmt durch Edmann-Abbau und Gensequenzierung (Riebel, 1996). Das N-terminale Met ist nicht abgebildet, da dieses posttranslational abgespalten wird (siehe Abschnitt 4.1.3.1).

1.2.4 Strukturelle Bedeutung der R-ADH-Lb

Die Lösung der 3D-Struktur der R-ADH-Lb war in vielerlei Hinsicht interessant. So ist die R-ADH-Lb der erste Vertreter aus der Gruppe der SDR-Proteine, der eine Metallionenabhängigkeit zeigt. Desweiteren ist das Enzym thermisch außerordentlich stabil mit einem Aktivitätsmaximum von 50°C (Riebel, 1996), was die R-ADH-Lb neben dem weiten Substratspektrum für eine biotechnologische Anwendung prädestiniert. Die gelöste 3D-Struktur könnte ein rationales Design des Proteins ermöglichen, um z.B. die Kosubstratspezifität von einer NADP-Abhängigkeit zu einer NAD-Abhängigkeit zu ändern, was die Regenerierung des Kosubstrates in der biotechnologischen Anwendung erleichtern würde.

Zu einigen SDR-Proteinen besteht eine starke strukturelle Ähnlichkeit (siehe Abschnitt 4.1.10.7). Für eine eingehendere mechanistische Untersuchung war es notwendig eine hochaufgelöste 3D-Struktur eines SDR-Proteins zu erhalten.

1.3 Die D-AO-Tv

Die hier untersuchte D-Aminosäureoxidase gehört zur Gruppe der Aminogruppen-oxidierenden-Oxidoreduktasen mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor (EC 1.4.3.). Die D-Aminosäureoxidasen bilden darin wiederum eine eigene Untergruppe (EC 1.4.3.3). Vertreter dieser Gruppe finden sich sowohl in

Säugetieren als auch in Mikroorganismen.

1.3.1 Historie und Biochemie der D-Aminosäureoxidasen

Erstmals wurde eine D-Aminosäureoxidaseaktivität in Säugetiergeweben 1935 beschrieben (Krebs, 1935). Seit dem ist das Enzym in Hefe, Pilzen, Mollusken, Insekten, Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und einer Reihe von Säugetiergeweben gefunden worden (Meister (1965), Gavazzi et al. (1987)). Die prokariotischen Vertreter sind üblicherweise membrangebunden und sind wahrscheinlich Monooxygenasen (Moreno, 1986) oder Dehydrogenasen (Olsiewski et al., 1980). Die physiologische Funktion der D-AOs ist bis heute Gegenstand intensiver Forschung und ihre Rolle im Metabolismus viel diskutiert. Sowohl D-Aminosäuren werden als natürliche Substrate in Betracht gezogen (Konno and Yasumura, 1992), welche sich in bakteriellen Zellwänden und in mikrobiellen Peptidantibiotika befinden, als auch andere Stoffwechselmetabolite wie Thiazolidin-2-Carboxylat (Hamilton et al., 1979). D-Asp und D-Glu werden von den meisten D-AOs nicht umgesetzt. Zur Oxidation dieser Aminosäuren verfügen diese Organismen über eine D-Aspartatoxidase (EC 1.4.3.1, Tedeschi et al. (1999), Kera et al. (1998)).

In Säugetieren ist die D-AO vermutlich für den Abbau der D-Aminosäuren des Peptidoglycangerüsts der Zellwand von z.B. Darmbakterien erforderlich (Konno and Yasumura, 1992). D-Aminosäuren entstehen weiterhin bei dem Kochen von Nahrungsmitteln oder der Fermentation durch Razemisierung von L-Aminosäuren (Brückner and Hansch, 1989).

Neuerdings wird für D-Ser, welches die D-AO stark aktiviert, eine wichtige Rolle bei der Neurotransmission diskutiert (Snyder and Kim, 2000). Dies könnte die hohe D-AO-Konzentration im Gehirn von Säugetieren erklären (Konno and Yasumura, 1992).

Die am besten charakterisierte D-AO ist die aus Schweineniere. Von diesem Enzym wurde erstmals eine vollständige Aminosäure- (Ronchi et al., 1982) und die Nucleotidsequenz der cDNA (Fukui et al., 1987) bestimmt. 1996 konnte unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen die 3D-Struktur gelöst werden (Mattevi et al. (1996), Mizutani et al. (1996)).

Bis heute sind auch von einer ganzen Reihe anderer D-AOs die Primärstrukturen (Konno and Yasumura (1992), Gonzalez et al. (1997), Alonso et al. (1998)) bestimmt worden. Besonders die mikrobiellen D-AOs sind heutzutage von großer technischen Bedeutung (siehe Abschnitt 1.3.2). Daher wäre die Lösung der 3D-Struktur eines mikrobiellen Enzyms von großem Nutzen.

Im Zuge der 3D-Strukturlösung konnten eingehende mechanistische Untersuchungen angestellt werden (Mattevi et al., 1997). Demnach erfolgt die Oxidationsreaktion über einen Hydridtransfer vom C_α-Kohlenstoff des Substrates auf den N5-Stickstoff des Isoalloxazinteils des FAD. Die Reaktion läuft formal nach folgendem Schema ab:

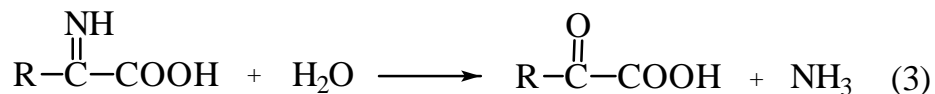
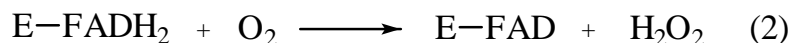
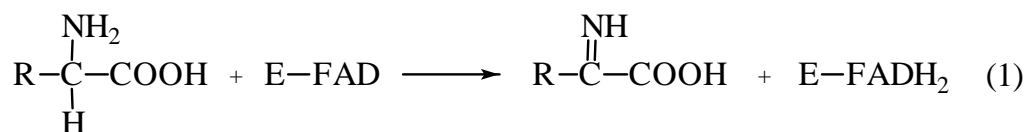


Abbildung 1.3: Reaktionsschema der D-Aminosäureoxidasen. (1): Oxidation des C_α-Kohlenstoffs und Reduktion des FAD. (2): Reoxidation des FADH₂ durch molekularen Sauerstoff. (3): Hydrolyse des α-Iminosäureintermediats zur α-Ketosäure.

Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation des C_α-Kohlenstoffs und die Reduktion des enzymgebundenen Kosubstrates FAD (siehe Reaktionsgleichung (1)), das durch molekularen Sauerstoff wieder in den oxidierten Zustand überführt wird (siehe Reaktionsgleichung (2)) Im zweiten Schritt der Reaktion wird das α-

Iminosäure-Zwischenprodukt spontan zur α -Ketosäure hydrolysiert (siehe Reaktionsgleichung (3)). Das intermediär gebildete Wasserstoffperoxid wird durch eine Katalase abgebaut, die wie die D-AO in den Peroxisomen oder den Mikrosomen lokalisiert ist (Van den Munckhof, 1996). Für prokariotische D-AOs gibt es bisher keinen Beweis der simultanen Produktion von Wasserstoffperoxid.

Die Reaktion verläuft streng stereospezifisch nur in der oben gezeigten Richtung. L-Aminosäuren werden also nicht als Substrate akzeptiert und haben auch keinen kompetitiv inhibierenden Einfluss auf die Enzymaktivität (Müller, 2000).

1.3.2 Technische Bedeutung der D-Aminosäureoxidasen

D-AOs werden technisch in Form von ganzen Zellen, als lösliches Enzym oder im immobilisiertem Zustand für biotechnologische Anwendungen genutzt. So werden sie für die qualitative und quantitative Analyse von D-Aminosäuren (Hikkanen and Decker, 1985), in Biosensoren (Gemeiner et al., 1993), zur Herstellung von L-Aminosäuren (Nakajima et al., 1990) und α -Ketosäuren (Brodelius et al., 1981) sowie der Umsetzung von Cephalosporin C zu Glutaryl-7-Aminocephalosporansäure (Pilone et al., 1995) eingesetzt.

Der letztgenannte Prozess stellt momentan die wichtigste industrielle Anwendung der D-AO dar. Das Folgeprodukt, die 7-Aminocephalosporansäure, ist ein Zwischenprodukt für die Herstellung vieler synthetischer β -Lactam-Antibiotika (Weltmarkt ca. 15 Mrd. US\$, Bayer 1995, Fischer (1998)). Das vorher angewandte rein chemische Verfahren ist sowohl in ökonomischer (hohe Drücke, niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit und Selektivität) als auch in ökologischer (organische Lösemittel und größere Mengen schwermetallhaltiger Abfälle) Hinsicht unterlegen (Kula, 1999).

1.3.3 Die D-AO-Tv

Die D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* (DSM 70714, EC 1.4.3.3) wurde im Rahmen der Doktorarbeit der Kooperationspartnerin Frau Martina Müller vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig (Arbeitsgruppe von Lutz Fischer) isoliert, biochemisch charakterisiert und hinsichtlich

biotechnologischer Anwendungen untersucht (Müller, 2000). Das Enzym bildet ein Homodimer (2×40.1 kDa inkl. Kosubstrat) mit je 356 Aminosäuren (siehe Abbildung 1.4) pro Untereinheit. Jedes Monomer enthält ein FAD-Molekül, das fest, aber nicht kovalent gebunden ist (Müller, 2000).

1	11	21	31	41	51	
1	MAKIVVIGAG	VAGLT TALQL	LRKGHEVTIV	SEFTPGDLSI	GYTSPWAGAN	WLT FYDGGKL 60
61	ADYDAVSYP I	LRELARSSPE	AGIRLINQRS	HVLKRDLPKL	EGAMSAICQR	NPWFKNTVDS 120
121	FEIIEDRSRI	VHDDVAYLVE	FASVCIHTGV	YLNWLSQCL	SLGATVVKRR	VNHIKDANLL 180
181	HSSGSRPDVI	VNCSGLFARF	LGGVEDKKMY	PIRQVV LVR	NSLPFMAFS	STPEKENEDE 240
241	ALYIMTRFDG	TSIIGGCFQP	NNWSSEPDP S	PTHRLSRAL	DRFPELTKDG	PLDIVRECVG 300
301	HRPGREGGPR	VELEKIPGVG	FVVHNYGAAG	AGYQSSYGMA	DEAVSYVERA	LTRPNL

Abbildung 1.4: Aminosäuresequenz der D-AO-Tv, bestimmt durch Sequenzierung der cDNA durch Chatterjee und Müller im hiesigen Labor (Daten nicht gezeigt).

Das Enzym setzt neben proteinogenen Aminosäuren, Cephalosporin C und einige nichtproteinogenen Aminosäuren um. Gar nicht oder nur schwach werden D-Thr, D-Asp, D-Glu und Gly als Substrate akzeptiert (Müller, 2000). Desweiteren sind einige kompetitiv inhibierende Substratanaloga bekannt, die für eine Analyse des aktiven Zentrums, den Kristallisationsansätzen zugesetzt werden können. Vor Beginn der vorliegenden Arbeit waren mit diesem Enzym noch keine Kristallisationsansätze durchgeführt worden.

1.3.4 Strukturelle Bedeutung der D-AO-Tv

Die Lösung der dreidimensionalen Struktur der D-AO-Tv ist sowohl in wissenschaftlicher als auch in technischer Hinsicht von großem Interesse. Bisher konnte keine 3D-Struktur einer mikrobiellen D-AO gelöst werden. Lediglich die 3D-Struktur der D-AO aus Schweineniere, mit einer Sequenzidentität von 27 %, konnte bisher gelöst werden (Mattevi et al. (1996), Mizutani et al. (1996)).

Da mikrobielle D-AOs eine immer größere technische Bedeutung erlangen (siehe Abschnitt 1.3.2), könnte die Lösung der 3D-Struktur einer mikrobiellen D-AO

ein rationales Proteindesign unterstützen, um spezifische Proteincharakteristika zu verändern (siehe Abschnitt 1.1). Auch für andere biotechnologisch relevante mikrobielle D-AOs (D-AO aus *Fusarium solani* und aus *Rhodospiridium toruloides*) wäre die Struktur der D-AO-Tv von großem Nutzen, da die Primärstrukturen mit Sequenzidentitäten von über 30 % auf eine ähnliche 3D-Struktur schließen lassen.

1.4 Zielsetzung

Thema der Arbeit waren strukturelle Untersuchungen an zwei Oxidoreduktasen. Von beiden Enzymen waren zu Beginn der Arbeit keine Kenntnisse über die dreidimensionalen Strukturen vorhanden. Da die Kristallisierbarkeit von Proteinen schwer vorherzusagen ist, konnten die Ziele der Arbeit nicht genau definiert werden.

Von der **R-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*** waren ein Aufreinigungsschema und erste Kristallisationsbedingungen des Apoenzyms bekannt. Ziel der Arbeit war die Endreinigung des Enzyms und die anschließende Kristallisation eines ternären Komplexes des Enzyms mit Substrat und Kosubstrat. Anschließend sollten röntgendiffraktometrische Messungen durchgeführt werden, die Struktur mittels MR gelöst, verfeinert und ausgewertet werden.

Von der **D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis*** war ein Aufreinigungsschema, jedoch keine Kristallisationsbedingungen bekannt. Das Enzym sollte bis zur Homogenität aufgereinigt und so weit wie möglich röntgenkristallographisch untersucht werden, da nicht bekannt war, ob die Struktur mittels Molekularem Ersatz (MR) zu lösen war.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Analytik

2.1.1 Massenspektrometrie

In der Biochemie wird die Massenspektrometrie zur Bestimmung von Molekulargewichten bzw. Fragmenten von Molekülen, zur Sequenzierung von Peptiden (Proteomanalyse und Peptidkartierung), Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen und Glykosylierungen sowie zur Gewinnung von Teilstrukturinformationen, beispielsweise der Lokalisation von oberflächennahen Aminosäuren oder Disulfidbrücken, in der biochemischen Analytik angewendet (Lehmann, 1996). Das Verfahren benötigt sehr wenig Substanz (1–10 pmol), hat ein großes Auflösungsvermögen (je nach Ionisierungsmethode ± 1 –10 au) und erlaubt einen hohen Probendurchsatz auf Grund der kurzen Messdauer.

Die Methode beruht auf der Erzeugung von Ionen, der Beschleunigung dieser Ionen in einem elektrischen Feld (siehe Gleichung 2.1) und der anschließenden Trennung der Ionen, nach ihrer kinetischen Energie E_{kin} , die proportional zum Masse-Ladungsverhältnis $\frac{m}{z}$ ist (siehe Gleichung 2.2).

$$z \cdot e \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2} = E_{kin} \quad (2.1)$$

$$\Rightarrow E_{kin} \sim \frac{m}{z} \quad (2.2)$$

Im Folgenden sollen kurz die beiden verwendeten Ionisierungsverfahren erläutert werden. Bei der *matrix assisted laser desorption*-Methode (MALDI, Karas and Hillenkamp (1988)) werden makromolekulare Substanzen mit einem 10^3 – 10^4 -fachen Überschuss einer Matrixsubstanz ko-kristallisiert. Diese Matrixsubstanz wird durch die Einstrahlung eines Laserpulses verdampft, wobei die Makromoleküle mit in die Gasphase gerissen werden und durch Protonenabstraktion von

der Matrixsubstanz ionisiert werden. Die Detektion erfolgt nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld in einem Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF). Die Genauigkeit der Methode liegt, je nach Größe des Analyten und der Massengenauigkeit der Kalibriersubstanz, bei ± 10 au.

Bei der Elektrosprayionisation (ESI, Fenn et al. (1989)) passiert eine Lösung des Analyten eine positiv geladene Metallkapillare und wird beim Austritt aus der Kapillare zerstäubt. Die dabei entstehenden Tröpfchen verlieren allmählich immer mehr Lösungsmittel, wobei die Oberflächenladung ansteigt. Erreicht die Ladungsdichte an der Tropfenoberfläche eine gewisse Grenze (Rayleigh-Limit), so teilt sich der Tropfen. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Prozesses entstehen „nackte“ Ionen, die in einem Quadrupolanalysator getrennt und detektiert werden. Mit der ESI-MS kann eine Auflösung von ca. ± 1 au erreicht werden.

Beide Verfahren erlauben eine Molekulargewichtsbestimmung bis hin zu Massen > 100 kDa, wobei sich bei der ESI-MS weitere Möglichkeiten durch eine Kopplung mit einem Flüssigkeitschromatographen ergeben.

2.1.2 Dynamische Lichtstreuung

2.1.2.1 Grundlagen

Das von einem Laserstrahl gestreute Licht einer makromolekularen Probe, beispielsweise Proteine, DNA, Polysaccharide oder Mizellen, enthält Informationen über die Diffusionsrate der Teilchen in der Lösung. Diese Information kann zur Charakterisierung der hydrodynamischen Größe, der Konformation, der Interaktionen oder Aggregation der gelösten Biomoleküle verwendet werden (Santos and Castanho, 1996).

Bei der Messung werden Photonen im 90° -Winkel zur Einstrahlrichtung des Laserstrahls detektiert. Da sich die Moleküle in Lösung mit der Braun'schen Molekularbewegung fortbewegen, kommt es auf Grund konstruktiver und destruktiver Interferenz zu Fluktuationen der Intensität des gestreuten Lichtes. Diese Fluktuationen sind wegen der Bewegung der Moleküle zeitabhängig und somit auch von der Größe der Teilchen abhängig. Die Sammlung der Photonen innerhalb eines Zeitfensters und die anschließende Analyse (Autokorrelation) führt zu einem translationalen Diffusionskoeffizienten D_t . Dieser kann über die

Funktion $G(\tau)$, die die Korrelation des gestreuten Lichtes als Funktion einer Zeitkonstante τ wiedergibt, berechnet werden:

$$G(\tau) = 1 + e^{-2 \cdot D_t \cdot q^2 \cdot \tau} \quad (2.3)$$

$$\text{mit } q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n_s \cdot \sin \frac{\Theta}{2}}{\lambda} \quad (2.4)$$

Der Wellenvektor q ist abhängig vom Streuwinkel Θ , dem Brechungsindex n_s und der Wellenlänge λ des eingestrahnten Laserlichtes. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung kann daraus der hydrodynamische Radius R_H berechnet werden:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_t} \quad (2.5)$$

Dabei ist k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur und η die Viskosität der Lösung. Auf diese Weise kann R_H und die Größenverteilung der Moleküle in Lösung bestimmt werden. Die minimale bestimmbare Partikelgröße beträgt etwa 4 kDa.

2.1.2.2 Auswertung

Die hier beschriebene Auswertung bezieht sich auf die Verwendung des Programms DYNAMICS V3.0 (Fa. Protein Solutions). Das Programm bietet zwei verschiedene Auswertemodi zur Berechnung des Molekulargewichtes M_W an, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Betrachtet man den Analyten als annähernd kugelförmig, so bietet sich das *globular*-Modell an.

$$M_W = (1.549 \cdot R_H)^{2.426} \quad (2.6)$$

Dabei entspricht 1.549 dem $R_H - \text{Faktor}$ und der Exponent wird mit 2.426 vorgegeben.

Nimmt man an, dass die gemessenen Makromoleküle nicht kugelförmig sind – was bei den meisten Biomolekülen der Fall ist – so bietet sich das *Volume Shape Hydration Model* zur Auswertung an. Dabei wird durch die *Reibungsverhältnis* die Molekülform in die Berechnung einbezogen.

$$M_W = \frac{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot N_a \cdot \left(\frac{R_H}{\text{Reibungsverhältnis}} \right)^3}{\text{spezifisches Volumen}} \quad (2.7)$$

Die Werte für die *Reibungsverhältnis* und das *spezifische Volumen* sind abhängig vom gewählten Molekulargewichtsbereich bzw. des Modellmoleküls, das für die Auswertung verwendet wurde. Diese Werte sind experimentell bestimmt worden und werden vom Programm vorgegeben (Santos and Castanho, 1996). Desweiteren erlaubt das Program eine Unterscheidung zwischen monodispersen und polydispersen Proben, sodass eine Molekulargewichtsverteilung gemessen werden kann.

2.1.3 CD-Spektroskopie

2.1.3.1 Grundlagen

Die CD-Spektroskopie kann zur Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten bei Proteinen verwendet werden. Eine Substanz hat dann ein CD-Signal, wenn sie unterschiedliche Wechselwirkungen mit links- und rechts-zirkularpolarisiertem Licht hat. Bei Proteinen werden die CD-Spektren im fernen UV z.B. bei 250–180 nm gemessen. Der Chromophor der Proteine, der in diesem Bereich absorbiert, ist die Amid-Gruppe der Peptid-Bindung. Die Amid-Gruppe hat hier zwei Übergänge: $n \rightarrow \pi^*$ ($\epsilon \approx 20/M \cdot cm$ und $\lambda_{max} \approx 220 nm$) und $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\epsilon \approx 7000/M \cdot cm$ und $\lambda_{max} \approx 195 nm$). Die Amidgruppe ist ein inhärent achiraler Chromophor. Die für die CD-Aktivität notwendige Chiralität wird durch das benachbarte chirale Zentrum am C_α -Atom induziert. Es hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Sekundärstrukturen unterschiedliche UV-CD-Spektren liefern. Die Aufspaltung der einzelnen Übergänge in mehrere Banden ist auf das sogenannte *Exciton-splitting* zurückzuführen.

Bei einer Messung wird mit einer Frequenz im kHz-Bereich abwechselnd links und rechts zirkular polarisiertes Licht erzeugt. Gemessen werden dann die unterschiedlichen Extinktionen (ε). Der Unterschied (Anisotropiefaktor, g) ist bei Proteinen relativ gering. Wegen des zusätzlich geringen Signal-Rausch-Verhältnisses gerade bei kurzen Wellenlängen müssen Spektren akkumuliert werden.

$$\text{Anisotropiefaktor} \quad g = \frac{\varepsilon_{rechts} - \varepsilon_{links}}{\varepsilon_{unpolarisiert}} = \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon} \approx 10^{-4} \quad (2.8)$$

Die gemessenen Unterschiede der molaren Extinktionskoeffizienten werden aus historischen Gründen meist mit folgender Gleichung in die spezifischen Elliptizitäten $[\Theta]$ umgerechnet.

$$[\Theta] = \frac{100 \cdot \Theta}{l \cdot c} = 3298 \cdot \Delta\varepsilon, \quad [\Theta] \text{ in } \frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}_{aa}} \quad (2.9)$$

Dabei ist $[\Theta]$ die spezifische Elliptizität, Θ die konzentrationsabhängige Elliptizität, l die Weglänge in der Küvette und c die Proteinkonzentration.

Neben der Bestimmung der Sekundärstrukturgehalte können CD-spektroskopische Untersuchungen auch dazu verwendet werden, Denaturierungen von Proteinen durch Temperatur, pH-Verschiebungen oder andere Substanzen (wie z.B. Harnstoff) zu detektieren. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes werden bei α/β -Proteinen in einem flachen Temperaturgradienten die CD-Signale bei 222 nm und bei $\alpha + \beta$ -Proteinen bei 208 nm gemessen (Beck et al., 1996). Die Existenz eines *isodichoren* Punktes zeigt außerdem, dass es sich bei einem solchen Übergang um einen direkten Übergang zwischen zwei Zuständen handelt.

2.1.3.2 Auswertung

Zur Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten aus CD-Spektren stehen eine Anzahl unterschiedlicher Programme zur Verfügung (Greenfield, 1996). Entscheidend für alle moderneren Auswertungsprogramme ist die Eingabe von spezifischen Elliptizitäten, weshalb eine sehr genaue Proteinkonzentration angegeben werden muss ($\pm 10 \%$).

Bei allen Programmen wird mit einem Basisdatensatz dem gemessenen Spektrum ein theoretisches Spektrum angeglichen. Als Basisdatensatz dienen zunächst Peptide mit *einer* Sekundärstruktur, später dann CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Kristallstruktur. Bei den heute üblichen Verfahren wird vereinfachend davon ausgegangen, dass sich die CD-Signale der einzelnen Sekundärstrukturelemente linear addieren. Eine große Beschränkung ist darin zu sehen, dass die einzelnen Sekundärstrukturelemente je nach Größe und Konformation unterschiedliche CD-Spektren liefern und dass die Wechselwirkungen der einzelnen Sekundärstrukturen untereinander, sowie die Beiträge der aromatischen Aminosäuren unberücksichtigt bleiben. Dies führt dazu, dass man mit Fehlern von 10 Prozentpunkten bei α -Helices und mehr bei anderen Sekundärstrukturen rechnen muss.

2.1.4 Sekundärbestimmung aus der Proteinsequenz

Es gibt eine Reihe von Methoden, mit denen man die Sekundärstrukturgehalte von Proteinen nicht aus dem CD-Spektrum, sondern aus der Proteinsequenz ermitteln kann. Grundlage aller zur Verfügung stehenden Programme ist die statistische Auswertung von bekannten Röntgenstrukturen hinsichtlich der Sekundärstrukturen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Programm PREDATOR verwendet (Frishman and Argos, 1996).

Die statistische Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren in den einzelnen Sekundärstrukturen ist der Ausgangspunkt der Algorithmen von Garnier et al. (1978) (GOR I) und Gibrat et al. (1987) (Gibrat). Beim Algorithmus von Levin et al. (1986) (homologue) werden bei Sequenzabschnitten Ähnlichkeiten gesucht. Der Algorithmus von Deléage and Roux (1987) (DPM - double prediction method) verwendet ein Mehrstufenverfahren. Bei diesen Programmen werden Genauigkeiten in einem Dreistufenmodell (α -Helix, β -Faltblatt und Rest) von 57–63 % pro Residuum erreicht.

2.2 Proteinröntgenstrukturanalyse

2.2.1 Kristallisation von Proteinen

Voraussetzung der Röntgenstrukturanalyse ist die Herstellung geeigneter Kristalle. Eine Vielzahl von Faktoren haben Einfluss auf das Kristallisationsverhalten von Proteinen. Unter anderem sind dies:

- Homogenität der Proteinprobe (Mikro- und Makrohomogenität)
- pH-Wert und Puffer
- Temperatur
- Ionenstärke und Art des Salzzusatzes
- Konzentration und Art des Fällungsmittels
- Additive wie Inhibitoren, Metallionen, Detergenzien
- Konzentration der Proteinprobe
- Kristallisationstechnik

Die Kristallisation erfolgt aus einer Lösung heraus, in der das Protein übersättigt ist. Übersättigungen erreicht man durch pH-Variation zum isoelektrischen Punkt hin, durch geringe Ionenstärken (Einsalzeffekt), hohe Salzkonzentrationen (Aus-salzeffekt) oder durch Zugabe eines Fällungsmittels.

Die unterschiedlichen Fällungsmittel haben dabei verschiedenste Einflüsse auf das Protein. Hohe Salzkonzentrationen führen zu einer Konkurrenz um Hydratwasser, die Proteine werden dehydratisiert und neigen zur Aggregation. Organische Lösungsmittel, vor allem kurze aliphatische Alkohole wie Ethanol, Isopropanol etc. verringern die Dielektrizität des Lösungsmittels und führen darüberhinaus zu einer Konkurrenz um Hydratwasser. Die gleichen Effekte haben langkettige polare Polymere wie Polyethylenglykole, die zusätzlich noch die Struktur des Wassers beeinflussen.

Proteinkristalle sind sehr empfindlich. Sie werden durch wenige Wechselwirkungen zusammengehalten und enthalten einen großen Anteil an ungeordnetem Lösungsmittel (20–80 %, Andersson and Hovmöller (2000)). Dies hat einen großen Einfluss auf das kristallographische Verhalten und die Auswertung der Röntgenmessungen. Andererseits lassen die großen Lösungsmittelkanäle auch die Diffusion von Inhibitoren, Substraten oder Schwermetallatomen zu und ermöglichen z.B. enzymatische Reaktionen im Kristallverband.

2.2.1.1 Kristallisationstechniken

Das Phasendiagramm (siehe Abbildung 2.1) verdeutlicht die Vorgänge während einer Kristallisation. Kritisch ist dabei die Bildung von stabilen Kristallisationskeimen, aus denen dann größere Kristalle wachsen können. Zur Bildung der Kristallisationskeime muss eine höhere Fällungsmittelkonzentration vorliegen als für das weitere Wachstum der Kristalle. Um nicht in den Präzipitationsbereich zu gelangen, wird bei Diffusionsmethoden versucht, eine langsame Übersättigung der Lösung zu erreichen.

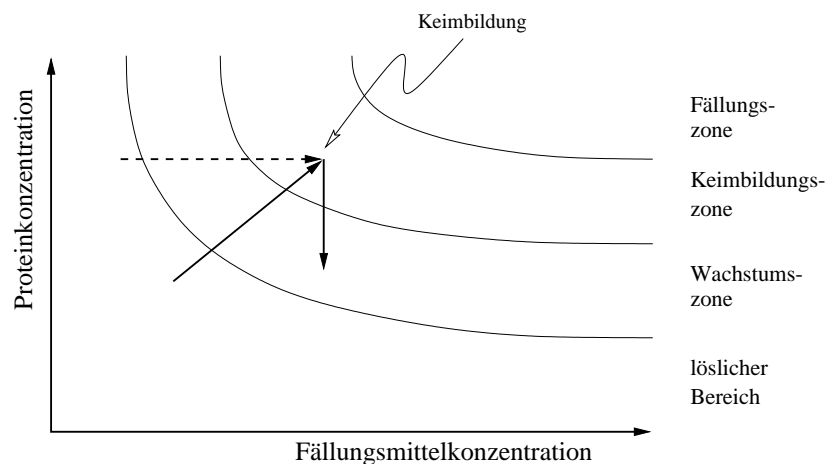


Abbildung 2.1: Phasendiagramm bei der Kristallisation. Die Pfeile zeigen den Verlauf einer Kristallisation bei Dampfdiffusions- (durchgezogen) und Dialyseverfahren (gestrichelt) an.

Bei der Dampfdiffusionsmethode (siehe Abbildung 2.2) befindet sich der Tropfen

mit der Proteinlösung über den Dampfraum in Kontakt mit einem Reservoir, welches das Fällungsmittel enthält. Der Tropfen wird aus variierenden Anteilen von Proteinlösung, Fällungsmittel und eventuell Additiven gemischt. Während der Gleichgewichtseinstellung kommt es durch allmähliche Destillation der flüchtigen Bestandteile der Lösungen (vor allem Wasser, aber auch flüchtige Salze und organische Lösungsmittel) im Tropfen zu einer langsamen Erhöhung der Fällungsmittel- und Proteinkonzentration. Je nach den gewählten Bedingungen bleibt das System im löslichen Bereich, gelangt in die Präzipitations-, die Keimbildungs- oder die Wachstumszone. Ziel ist es, das System möglichst gerade an die Keimbildungszone zu bringen, so dass sich wenige Keime bilden, aus denen dann große Kristalle wachsen.

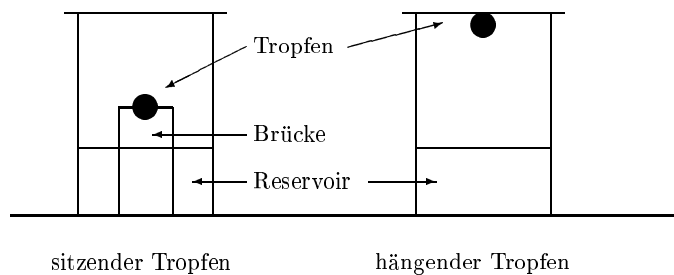


Abbildung 2.2: Kristallisation durch Dampfdiffusion mit sitzendem und hängendem Tropfen.

Die Methoden des sitzenden und hängenden Tropfens, die während der vorliegenden Arbeit ausschließlich verwendet wurden, unterscheiden sich durch unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten, so dass die Ergebnisse der einen Methode nicht unbedingt auf die andere Methode übertragen werden können. Der Endzustand der äquilibrierten Lösungen ist jedoch gleich.

Daneben finden noch eine Reihe anderer Kristallisationstechniken Anwendung. Bei der Dialysemethode wird die Proteinlösung in einer kleinen Dialysezelle gegen das Fällungsmittel dialysiert. Dabei ändert sich (siehe Abbildung 2.1) im wesentlichen nur die Fällungsmittelkonzentration.

Bei *batch*-Methoden wird das Protein gleich mit dem Fällungsmittel in der endgültigen Konzentration versetzt, sodass sich das System von Beginn an in der Keimbildungszone des Phasendiagramms in Abbildung 2.1 befindet. Durch ein

Überschichten des Gemisches mit Öl wird eine Verdunstung des Lösemittels vermieden bzw. stark verlangsamt.

2.2.1.2 Suche nach Kristallisationsbedingungen

Die Kristallisationsbedingungen für ein Protein können nicht vorhergesagt werden, sondern müssen empirisch ermittelt werden. Es gibt verschiedene Wege, auf denen man optimale Kristallisationsbedingungen ermitteln kann.

McPherson (1990) hat eine logisch arbeitende Vorgehensweise vorgeschlagen, bei der man die beiden üblichsten Fällungsmittel Ammoniumsulfat und PEG 4000 verwendet und sich dann mit Hilfe eines Fließschemas an gute Fällungs- bzw. Kristallisationsbedingungen annähert.

Eine andere Möglichkeit ist das faktorielle Design eines Kristallisationsexperiments, bei dem aus einer Auswahl an Parametern (Fällungsmittel, Konzentrationen, Salzzusätze) von Versuch zu Versuch mehrere Parameter verändert werden. Die Schwierigkeit besteht in der Auswahl der Parameter und die Auswertung der Experimente, wenn bestimmte Effekte einem Parameter zugeordnet werden müssen. Eine Möglichkeit zur Planung von Kristallisationsansätzen nach dem unvollständigen faktoriellen Design (Carter and Carter, 1978), bei dem eine vorgegebene Anzahl an Versuchen verwendet wird, bietet das Programm SAMBA (Audic et al., 1997).

Jancarik and Kim (1991) und später Cudney et al. (1994) haben Screeningverfahren entwickelt, die die bislang erfolgreichsten Kristallisationsbedingungen von Proteinen enthalten. Durch die weite Streuung der Bedingungen erhält man mit wenig Proteinverbrauch meist schon Startbedingungen für die Optimierung.

Bei der Optimierung der Kristallisationsbedingungen werden verschiedene Parameter wie Fällungsmittelkonzentration, pH-Wert, Salzkonzentration etc. um die Startbedingung variiert. Dabei wird erst in recht groben, dann in immer feineren Schritten vorgegangen.

2.2.2 Röntgenkristallographie

2.2.2.1 Röntgendiffraktometrie

Ein Charakteristikum von Proteinkristallen ist die begrenzte Haltbarkeit im Röntgenstrahl. Die Streufähigkeit der Kristalle nimmt mit zunehmender Messdauer deutlich ab. Um einen möglichst vollständigen Datensatz aus einer Messung zu erhalten, muss man für eine schnelle Datensammlung sorgen und kann zusätzlich sekundäre Effekte der Zerstörung der Kristalle im Röntgenstrahl durch Einfrieren verhindern (Cryokristallographie). Allerdings müssen für die Vermessung von Proteinkristallen geeignete Frostschutzmittel in der Kristallisationslösung vorhanden sein. Dies ermöglicht beim Einfrieren der Kristalle ein glasartiges Erstarren des Lösungsmittels in den Lösungsmittelkanälen im Kristall und auf der Außenseite des Kristalls.

Die rasche und effektive Sammlung qualitativ hochwertiger Daten wird heutzutage mit CCD- und Flächendetektoren ermöglicht, die eine hohe Auflösung und Empfindlichkeit bieten. Hinzu kommt die mittlerweile etablierte Datensammlung mit Synchrotronstrahlung, die eine hohe Intensität und niedrige Divergenz aufweist.

Dabei verwendet man im allgemeinen keine Weissenberg- oder Präzessions-techniken, deren Indizierung einfach ist, bei denen aber nur *eine* Schicht des reziproken Gitters abgebildet wird. Bei den sogenannten Rotationsaufnahmen werden Punkte aus verschiedenen Schichten des reziproken Gitters abgebildet, die während einer Rotation des Kristalls um einen kleinen Winkel $\Delta\Phi$ die Ewaldkugel schneiden (Reflexionsbedingung nach Ewald'scher Deutung). Aus jeder Schicht ist dies ein sichelförmiger Ausschnitt (*lune*). Ein großer Anteil der Reflexe auf einem Bild wird nur teilweise abgebildet und verteilt sich auf mehrere Aufnahmen. Da die einzelnen Schichten voneinander getrennt sein müssen, ist die Größe des Rotationswinkels $\Delta\Phi$ begrenzt und kann aus der längsten Achse der Einheitszelle r_{max} , der maximalen Auflösung D_{max} und der Mosaizität M nach Gleichung 2.10 abgeschätzt werden.

$$\Delta\Phi = \frac{D_{max}}{r_{max}} \cdot \frac{180^\circ}{\pi} - M \quad (2.10)$$

2.2.2.2 Indizierung und Integrierung

Da es sich bei den Rotationsaufnahmen um verzerrte Abbildungen etlicher Schichten des reziproken Gitters handelt, ist die Indizierung aufwendiger als bei anderen Aufnahmetechniken. Die Orientierung des Kristalls ist nicht bekannt und muss berechnet werden.

Bei Auswertungsprogrammen wie DENZO (Otwinowski and Minor, 1997) wird am ersten gemessenen Bild eine Autoindizierung vorgenommen. Dabei werden von den stärksten Reflexen alle möglichen Kombinationen von Indices aufgestellt. Wenn für einen Index bei allen Reflexen eines Bildes ganze Zahlen gefunden werden, dann ist eine Achse des Kristalls im realen Raum gefunden (*real space indexing*). Anschließend werden die anderen Achsen berechnet, die dann noch auf kristallographische Standardzellen umgewandelt werden. Mit Hilfe der Abweichungen der gefundenen Zellgeometrie von den Bravais-Gittern muss der Anwender eine Laue-Klasse bestimmen. Mit den nun bekannten Parametern werden anschließend die schwächeren Reflexe gefunden. Die Kristall- und Detektorparameter werden in mehreren Zyklen verfeinert, sodass die Positionen der Reflexe bestimmt werden.

Bei der Integration werden auf Basis der aus dem ersten Bild bestimmten Parameter bei allen Bildern die Stärke der Reflexe im Verhältnis zum Hintergrundrauschen bestimmt. Das Profil der einzelnen Reflexe wird aus den gemessenen Intensitäten und dem gemittelten Profil der umgebenden Reflexe berechnet (*profile fitting*).

2.2.2.3 Skalierung

Unter dem Begriff Skalierung wird die Zusammenfassung unterschiedlicher kristallographischer Daten verstanden. Damit ist die Vereinigung der zunächst getrennt ausgewerteten Aufnahmen gemeint, bei der die einzelnen Bilder auf ein gemeinsames Niveau gebracht werden, also gegeneinander skaliert werden.

Für die Skalierung muss eine Raumgruppe angegeben werden, die nach der Indizierung erst nur geschätzt und nach der Skalierung bestätigt werden muss. Auf Grund der Chiralität der Proteine sind bei Proteinkristallen nur 65 der 230 Raumgruppen möglich. Nichtenantiomorphe Raumgruppen lassen sich mit

Hilfe der systematischen Auslöschungen bestimmen, die durch Schraubenachsen innerhalb der kristallographischen Symmetrie zustande kommen. Praktisch wird dabei so vorgegangen, dass die Skalierungsprogramme die gemessenen Intensitäten an den Punkten angeben, an denen die Auslöschungen sein sollten, und diese mit dem Rauschen σ_I vergleichen.

In einem ersten Schritt werden die Intensitäten der symmetrieverwandten Reflexe verglichen und deren Verhältnisse bestimmt. Mit diesen relativen Skalierungsfaktoren k (siehe Gleichung 2.11), die z.B. unterschiedlich lange Belichtungszeiten und Kristallqualitäten berücksichtigen, werden nun die einzelnen Reflexe multipliziert. Der Faktor k_0 ist der relative Skalierungsfaktor für das jeweilige Bild. Der B -Faktor quantifiziert die Tatsache, dass Reflexe mit höherer Auflösung stärker anfällig für Strahlungszerstörung sind als Reflexe mit geringerer Auflösung. In der Gleichung ist somit k_0 der relative Skalierungsfaktor für ein Bild, k der Skalierungsfaktor für eine Observation unter Berücksichtigung des Strahlungszerfalls und \vec{S} der Streuvektor der einzelnen Observation. Die Reflexe, die sich über mehrere Bilder erstrecken, werden zusammengefasst. D.h. aus den integralen Intensitäten $I(\vec{S})_i^{int}$ für die einzelnen Aufnahmen werden relative Intensitäten $I(\vec{S})_i^{rel}$ berechnet. Mit Hilfe von Wilson-Plots (Wilson, 1942) wird die Skalierung auf ein absolutes Niveau gebracht.

$$k = k_0 \cdot e^{-B_0 \cdot |\vec{S}|^2} \quad (2.11)$$

Normalerweise werden die Intensitäten danach in Strukturfaktoramplituden umgewandelt, da diese von den meisten der heute gebräuchlichen kristallographischen Programme verwendet werden.

Für eine Einschätzung der Qualität des erhaltenen Datensatzes gibt es eine Anzahl von Parametern. Die Auflösungsgrenze wird durch das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt, wobei als Grenze $\frac{I}{\sigma_I} = 2 - 3$ angesehen wird. Bis zur Auflösungsgrenze sollte der Datensatz möglichst in einer großen Vollständigkeit und mit einer hohen Redundanz vorliegen. Der R_{sym} -Wert (siehe Gleichung 2.12) vergleicht die Intensitäten der symmetrieverwandten Reflexe und sollte für den gesamten Datensatz bis zur Auflösungsgrenze nicht wesentlich über 10 % liegen. Gute Datensätze haben R-Werte von unter 5 % (McRee, 1996). Der Wert wird aber

stark beeinflusst durch die Redundanz der Messungen und die Rigidität, mit der schlechte Daten verworfen werden (Blundell and Johnson (1976), McRee (1996)).

$$R_{sym} = \frac{\sum_{\vec{S}} \sum_{i=1}^N | \langle I(\vec{S})^{rel} \rangle - I(\vec{S})_i^{rel} |}{\sum_{\vec{S}} \sum_{i=1}^N I(\vec{S})_i^{rel}} \quad (2.12)$$

Dabei sind \vec{S} der Streuvektor, $\langle I(\vec{S})^{rel} \rangle$ die gemittelte Intensität des Reflexes mit dem Streuvektor \vec{S} und $I(\vec{S})_i^{rel}$ die Intensität der einzelnen Observationen.

Eine robustere Methode der Datenvalidierung ist durch den sogenannten R_{meas} , der die Multiplizität der Daten berücksichtigt, und der R_{mrgd} , der die Zunahme der Genauigkeit basierend auf der Mittelung äquivalenter Reflexe widerspiegelt, gegeben (Diederichs and Karplus, 1997).

2.2.2.4 Packungsdichte und Lösungsmittelgehalt

Die Packungsdichte und den Lösungsmittelgehalt von Proteinkristallen lässt sich aus dem Kristallvolumen (Volumen der asymmetrischen Einheit, $V_{asym.}$) pro Einheit des Molekulargewichts M_W (in Dalton) annähern. Dieser Koeffizient ist als V_M -Wert (Matthews, 1968) bekannt und wird meistens als Matthews-Koeffizient bezeichnet. Mit ihm lässt sich die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit abschätzen.

$$V_M = \frac{V_{asym.}}{M_W}, \quad 1.7 \cdot \frac{\text{\AA}^3}{Da} \leq V_M \leq 3.4 \cdot \frac{\text{\AA}^3}{Da} \quad (2.13)$$

Die oberen und unteren Grenzen für den Matthews-Koeffizienten wurden empirisch ermittelt. Die angegebenen Werte stammen aus der Originalpublikation von Matthews (1968), können in einigen Fällen aber nach oben erweitert werden. Der Lösungsmittelgehalt des Proteinkristalls (V_{Wasser}) liegt im allgemeinen zwischen 27 und 65 % (meistens bei 43 %, es wurden jedoch auch erheblich höhere Werte beobachtet) und kann wie folgt über das spezifische Partialvolumen des Proteins im Kristall (\bar{v}) abgeschätzt werden:

$$V_{Wasser} = 1 - \frac{1.66 \cdot \bar{v}}{V_M} \approx 1 - \frac{1.23}{V_M} \quad (2.14)$$

Andersson and Hovmöller (2000) fanden kürzlich eine analoge Gleichung, die den Packungskoeffizienten k (Anteil des Proteins am Volumen der Elementarzelle) entsprechend Gleichung 2.15 angibt.

$$k = \frac{Z \cdot V_{pro}}{V_{cell}} = \frac{19.5 \cdot Z \cdot N_{n-H}^{tot}}{V_{cell}} \quad (2.15)$$

Dabei sind V_{pro} und V_{cell} das Protein- und das Zellvolumen, Z die Anzahl der Proteinmoleküle in der Einheitszelle und N_{n-H}^{tot} die Anzahl aller Nicht-Wasserstoffatome exklusive der Wassermoleküle. Der mittlere gewichtete Packungskoeffizient k_w (Gewichtung über die Häufigkeitsverteilung der Raumgruppen) entspricht dem von Matthews (1968) bestimmten Wert (Andersson and Hovmöller, 2000).

2.2.2.5 Verzwillingung

„Unter Verzwillingung versteht man die *gesetzmäßige Verwachsung* von verschiedenen orientierten Domänen ein und der selben Struktur zu einem Zwillingskristall“ (Massa, 1996). In der Sichtweise des reziproken Raumes bedeutet dies, dass ein Zwilling ein Kristall mit einer Anomalie ist, bei der die Domänen des Kristalls einander so orientiert sind, dass ihre Beugungsgitter ganz oder teilweise überlappen (Chandra et al., 1999).

Unter der Zwillingsregel versteht man das Symmetrieelement, welches den einen Zwillingsanteil (Domäne) in den anderen überführt.

Generell unterscheidet man zwei Zwillingstypen. Bei epitaxialen, nicht-merohedrischen Zwillingen, kommt es zu keiner vollständigen Überlagerung der Reflexe, da die Gitter der beiden Zwillingspartner nicht vollständig überlappen. Derartige Zwillinge kann man häufig an Verwachsungen der Kristalle erkennen. Bei merohedrischen Zwillingen kommt es zu verschiedenen Orientierungen der Domänen im Kristall, was an der äußeren Form der Kristalle nicht zu erkennen ist, da die beiden Gitter exakt übereinander liegen. Sind die Volumina der

Domänen ungleich, so spricht man von ungleich merohedrischen Zwillingen. Bei gleichen Volumina der Domänen spricht man von perfekt merohedrischen Zwillingen.

Merohedrische Kristalle können nur entstehen, wenn eine höhere Symmetrie durch Rotation erreicht werden kann. Dies ist bei den Punktgruppen 3, 4, 6, 321, 312 und 23 der Fall. Perfekte Merohedrie kann zusätzlich zu den scheinbaren Raumgruppen 422, 432 und 622 führen (Chandra et al., 1999).

2.2.2.6 Pattersonfunktion

Die Pattersonfunktion, die in den folgenden Rotationsrechnungen verwendet wird, erhält man durch Fouriertransformation der Intensitätsfunktion. Dabei ist V das Volumen der Einheitszelle und F der Strukturfaktor mit dem Index hkl .

$$P(\vec{u}) = \frac{1}{V^3} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F(h, k, l)|^2 \cdot e^{2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (2.16)$$

Mit Hilfe der sogenannten nativen Pattersonfunktion können nichtkristallographische Symmetrieachsen, die parallel zu den kristallographischen Symmetrieachsen liegen und in der Selbstrotationsfunktion (s.u.) von den viel intensiveren Peaks der kristallographischen Achsen überdeckt werden, gefunden werden. In diesem Fall würde man in der nativen Pattersonkarte neben dem Ursprungspike, der immer auftritt, einen zweiten sogenannten Pseudoursprungspike beobachten.

2.2.2.7 Selbstrotationsrechnungen

Mit der Selbstrotationsfunktion $R(C)$ lassen sich lokale nichtkristallographische Symmetrien und damit die Lage von Molekülen in der asymmetrischen Einheit bestimmen. Dabei wird die Pattersonfunktion (s.o.) gedreht und das Maß an Überlappung mit der nicht gedrehten Pattersonfunktion berechnet.

$$R(C) = \int_V P(\vec{u}) \cdot P(C, \vec{u}) du \quad (2.17)$$

Dabei ist $P(\vec{u})$ die Pattersonfunktion des Moleküls, $P(C\vec{u})$ die mit der Rotationsmatrix C gedrehte Pattersonfunktion und V das durch die Länge des Rotationsvektors vorgegebene Volumen der Pattersonfunktion. Die Polarwinkel ϕ und ψ geben die Orientierung der Rotationsachse in einem orthogonalen Koordinatensystem an, κ den Rotationswinkel. Die Ergebnisse von Rotationsrechnungen werden in stereographischen Projektionen dargestellt (siehe Abbildung 4.43).

2.2.2.8 Molekularer Ersatz

Zur Bestimmung von Phaseninformation in der Proteinkristallographie bieten sich eine Reihe von Methoden an. Mit Hilfe von anomalen Streuern wie Schwermetallen kann über den multiplen isomorphen Ersatz (MIR) und *multiple anomalous diffraction* (MAD) das Phasenproblem gelöst werden. Mit der schnell wachsenden Rechenleistung von EDV-Systemen gewinnen in den letzten Jahren die *ab initio*-Methoden an Gewicht, bei denen über einen iterativen Prozess die Phasen ständig erweitert und verbessert werden. Eine weitere Methode, die ohne die Bestimmung experimenteller Phaseninformation auskommt, ist die Methode des Molekularen Ersatzes (MR). Hierfür ist die Existenz einer homologen Struktur für das gesuchte Modell erforderlich. Diese Methode soll im Folgenden besprochen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde.

Man macht sich bei der MR-Methode die Tatsache zu Nutze, dass Proteine mit einer ähnlichen Sequenz ($\gtrsim 30$ % Sequenzidentität) auch eine ähnliche Faltung aufweisen und daher auch eine ähnliche Fouriertransformierte der Dichtefunktion besitzen. Mit dieser Annahme wird dem unbekannten Protein sozusagen die Phaseninformation des Suchmodells „ausgeliehen“. Dazu ist es notwendig das Suchmodell möglichst genau in der Elementarzelle der unbekannten Struktur zu positionieren. Auf diese Weise erhält man ein Startmodell, das noch sehr stark von der Struktur des Suchmodells geprägt ist. Nach und nach muss dieser *model bias* in der Verfeinerung entfernt werden und durch Strukturinformation der gesuchten Struktur ersetzt werden.

Die Methode wird in zwei Schritten angewendet, um aus dem sechsdimensionalen Suchraum mit drei Rotations- und drei Translationsfreiheitsgraden, jeweils zwei dreidimensionale Probleme zu konstruieren. Auf diese Weise wird enorm

viel Rechenzeit eingespart.

Rotationssuche Im ersten Schritt wird die Orientierung des Suchmodells in der asymmetrischen Einheit der Einheitszelle der gesuchten Struktur bestimmt. Befinden sich mehrere Moleküle in der asymmetrischen Einheit der gesuchten Struktur, so muss für jedes Molekül die Orientierung bestimmt werden.

Die Suche nach der richtigen Orientierung des Suchmodells im Verhältnis zum Kristall (gesuchte Struktur) erfolgt in ähnlicher Weise wie in Abschnitt 2.2.2.7 durch die Drehung der Pattersonfunktion des Suchmodells gegen die Pattersonfunktion des Kristalls der gesuchten Struktur. Dabei werden durch geeignete Wahl des Pattersonradius nur die intramolekularen Vektoren (Selbstvektoren) berücksichtigt.

$$R(C) = \int_V P_1(\vec{u}) \cdot P_2(C, \vec{u}) du \quad (2.18)$$

$P_1(\vec{u})$ ist die Pattersonfunktion des Kristalls, $P(C, \vec{u})$ die mit der Rotationsmatrix C gedrehte Pattersonfunktion des Suchmodells und V das durch die Länge des Selbstvektors bestimmte Volumen der Pattersonfunktion. Dieses Volumen ist von der Größe des Suchmodells abhängig und muss individuell vom Anwender definiert werden.

Die Maxima der Rotationsfunktion $R(C)$ entsprechen den bestmöglichen Orientierungen der beiden Vektorsätze zueinander. Diese Lösung wird in Form von Eulerwinkeln $(\theta_1, \theta_2, \theta_3)$ (Rossmann and Blow, 1962) oder Polarwinkeln (κ, ϕ, ψ) als Vorinformation in die folgende Translationssuche hineingesteckt.

Patterson-Korrelationsverfeinerung Zur Verbesserung der Ergebnisse der Rotationssuche kann eine PC-Verfeinerung (*patterson correlation refinement*) als Vorbereitung auf die Translationssuche durchgeführt werden. Dabei wird das annähernd richtig orientierte Modell in eine triklinen Zelle mit exakt den Gitterkonstanten des Kristalls gelegt. Ein auf dieser Grundlage berechneter Datensatz wird mit den gemessenen Daten korreliert. Durch eine Starre-Körper-Verfeinerung wird versucht, den Korrelationswert zu maximieren. Da für das Modell eine

unsymmetrische Zelle definiert worden ist, wirken sich nur Rotationsparameter auf die Zielfunktion aus, während die Position (Translation) beliebig ist.

Die PC-Verfeinerung ist eine sehr schnelle Methode zur Rotationsverfeinerung, die insbesondere dazu dienen soll, aus der Liste der Rotationspeaks die wirklich signifikanten zu identifizieren sowie die Modellstruktur durch Freigabe einzelner Domänen und Struktur motive so zu verfeinern, dass die Erfolgsaussichten für die nachfolgende Translationssuche deutlich besser werden.

Translationssuche Bei der Translationssuche wird das richtig orientierte Suchmodell unter Verwendung der kristallographischen Symmetrie bewegt, um die korrekte Position im Kristall, also eine maximale Übereinstimmung mit den Diffraktionsdaten, zu finden. Dabei wird die Pattersonfunktion des Kristalls mit der Pattersonfunktion des Suchmodells an einer spezifizierten Stelle in der Einheitszelle des Kristalls verglichen. Im Gegensatz zur Rotationssuche werden hier nur intermolekulare Vektoren berücksichtigt.

$$R(\tau) = \int_V P_1(\vec{u}) \cdot P_2(\tau, \vec{u}) du \quad (2.19)$$

Dabei ist $P_1(\vec{u})$ die Pattersonfunktion des Kristalls, $P(\tau, \vec{u})$ die mit der Translationsmatrix τ bewegte Pattersonfunktion des Suchmodells und V das durch die Länge des Translationsvektors bestimmte Volumen der Pattersonfunktion. Dieses Volumen ist von der Größe des Suchmodells abhängig und muss individuell vom Anwender definiert werden.

Die Translationssuche ist der kritische Schritt beim Molekularen Ersatz, denn der Erfolg ist sowohl von den Fehlern im Suchmodell als auch von der Exaktheit der Rotationslösung abhängig. Hinzu kommt ein niedriges Signal-Rausch-Verhältnis, da nur die intermolekularen Vektoren einen Beitrag leisten und die intramolekularen Vektoren ein starke Hintergrundrauschen erzeugen.

2.2.2.9 Strukturverfeinerung

Nachdem die 3D-Struktur durch die MIR-, MAD- oder MR-Methode „gelöst“ worden ist, kommt man zu einem Startmodell, das bisher nur Grundzüge der

gesuchten Struktur enthält. Ziel der Strukturverfeinerung ist die schrittweise und systematische Veränderung des Startmodells, sodass es zur wirklichen Struktur konvergiert. Als Maß für den Fortschritt der Verfeinerung und als Qualitätskriterium für das Modell gilt der kristallographische R-Wert R_{cryst} . Er gibt die Übereinstimmung zwischen den aus dem Modell berechneten $|F_{calc}|$ und den gemessenen Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ wider.

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k \cdot |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (2.20)$$

Der R_{cryst} ist von einem Skalierungsfaktor k zwischen den gemessenen und den berechneten Daten abhängig und soll im Verlauf der Verfeinerung einem Minimum zustreben. Der R_{cryst} wird immer zusammen mit den Auflösungsgrenzen angegeben.

Der R_{cryst} kann im Laufe der Verfeinerung sehr niedrige Werte annehmen, obwohl das Strukturmodell noch grobe Fehler enthält (Brünger, 1987). Dieses Phänomen kommt dadurch zustande, dass zu viele Parameter in die Verfeinerung einfließen (Brünger, 1992a). Um diese Überverfeinerung (*overfitting*) zu vermeiden, schlug Brünger (1992a) die Einführung des R_{free} vor. Er gilt als verlässlicher Indikator der Genauigkeit des Modells und wird zur Kreuzvalidierung des Modells verwendet. Der Reflexdatensatz wird hierfür in einen Testdatensatz T und einen Arbeitsdatensatz W eingeteilt, wobei der Testdatensatz eine zufällige Auswahl von ca. 5–10 % alle Reflexe enthält. Die Verfeinerung wird nur mit dem Arbeitsdatensatz durchgeführt, aus dem der R_{work} analog Gleichung 2.20 berechnet wird und der R_{free} wird nur aus dem Testdatensatz ebenfalls analog Gleichung 2.20 berechnet. Nach einem sinnvollen Verfeinerungsschritt sollten sowohl der R_{work} als auch der R_{free} fallen.

Brünger (1997) empfiehlt einen Grenzwert von 40 % für den R_{free} , d.h. Modelle mit freien R-Werten über 40 % sollten mit Vorsicht behandelt werden. Desweiteren sollte die Differenz zwischen R_{free} und R_{work} klein sein bzw. das Verhältnis zwischen beiden Werten nahe bei eins sein (Kleywegt and Brünger, 1996).

Unterbestimmung Bei der Verfeinerung müssen für jedes Atom drei unabhängige Ortskoordinaten, ein isotroper Temperaturfaktor oder bei hochaufgelösten Strukturen drei anisotrope Temperaturfaktoren und manchmal ein Besetzungsfaktor (z.B. bei multiplen Konformationen) verfeinert werden. Dieser großen Anzahl zu verfeinernder Parameter steht eine begrenzte Anzahl unabhängiger Daten $|F_{obs}|$ gegenüber. Sofern kein hochaufgelöster Datensatz vorliegt, ist das System unterbestimmt. Um eine gewisse Überbestimmung zu gewährleisten, müssen zusätzliche Informationen wie nichtkristallographische Symmetrie oder stereochemische Parameter in die Verfeinerung einbezogen werden. Dies kann auf zwei verschiedene Weisen geschehen:

- Die Reduzierung der zu bestimmenden Parameter durch strikte stereochemische Zwänge (*constraints*, Brändén and Jones (1990)). Beispielsweise können Teile der Struktur als starre Körper behandelt werden, sodass deren Koordinaten nur synchron verändert werden dürfen. In der Praxis kann dies allerdings nur schwer realisiert werden. Deshalb werden *constraints* vor allem zu Beginn der Verfeinerung verwendet.
- Die Erhöhung der Datenmenge durch Einführung neuer Observablen (so genannter Pseudoreflexe) durch die Einführung flexibler stereochemischer Randbedingungen (*restraints*, Hendricksen and Konnert (1980a), Hendricksen and Konnert (1980b)). *Restraints* umfassen Vorgaben für Bindungslängen und -winkel, Torsionswinkel und van der Waals-Kontakte, die innerhalb bestimmter Fehlergrenzen schwanken dürfen. Mit dieser Methode können kleinere Strukturteile leicht bewegt werden, größere Strukturteile hingegen nicht.

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfeinerungsrechnungen wurden entweder mit *constraints* oder mit *restraints* durchgeführt. Eine denkbare Variante wäre Verfeinerung ganz ohne stereochemische Vorgaben (*unrestraint*). Dies setzt jedoch ein hohes Daten-zu-Parameter-Verhältnis (hohe Auflösung) und eine recht genaue Fixierung der Atome (niedrige Temperaturfaktoren) voraus.

Im Folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfeinerungsalgorithmen kurz erläutert werden.

Moleküldynamik Gerade zu Beginn der Verfeinerung hat das Strukturmodell eine Reihe von fehlerhaften Bereichen. Bei einer Verfeinerungsrechnung soll die Gesamtenergie der Struktur minimiert werden. Dabei kann es, gerade wenn das Strukturmodell noch große Unterschiede zur wahren Struktur aufweist, zu einer Konvergenz in ein lokales Energieminimum kommen. Um in den Konvergenzbereich des globalen Minimums zu kommen, kann das Modell entweder manuell korrigiert oder mit einer Moleküldynamik (MD) verändert werden (Brünger, 1992b).

Bei einer MD wird die gesamte Struktur auf mehrere Tausend K aufgeheizt und dann langsam abgekühlt. Durch die starke thermische Bewegung der Atome kann die Struktur mögliche lokale Minima auf der Potentialhyperfläche verlassen und das globale Minimum erreichen bzw. dort bleiben. Die Atome bewegen sich dabei innerhalb eines Kraftfeldes, das aus physikalisch-chemischen Randbedingungen (*restraints/constraints*) zusammengesetzt ist.

Der Vorteil einer MD ist ihr großer Konvergenzradius (Kleywegt and Jones, 1997), d.h. selbst Atome oder Gruppen, die ursprünglich mehrere Å von ihrer endgültigen Position entfernt waren, werden korrekt verfeinert. Ohne manuelle Eingriffe können so auch größere Fehler korrigiert werden.

MD-Rechnungen wurden in der vorliegenden Arbeit mit den Programmpaketen X-PLOR (Brünger, 1992b) und CNS (Brünger et al., 1998) durchgeführt.

Methoden der kleinsten Fehlerquadrate und der maximalen Wahrscheinlichkeit Die mathematischen Grundlagen der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*least squares*, LSQF) und die neuere Methode der maximalen Wahrscheinlichkeit (*maximum likelihood*, MLKF) wurden eingehend von Read (1990) diskutiert. Daher sollen an dieser Stelle die Methoden nur kurz dargestellt und die Vorzüge der MLKF-Methode deutlich gemacht werden.

Beide Methoden verfeinern die Funktion Φ gegen die Atomparameter auf der Grundlage eines Vergleiches der gemessenen $|F_{obs}|$ und der berechneten $|F_{calc}|$ Strukturfaktoramplituden:

$$\Phi = \sum_{hkl} w_{hkl} \cdot (|F_{obs}| - k \cdot |F_{calc}|)^2 \quad (2.21)$$

Bei diesem Ansatz, der sowohl für die LSQF- als auch für die MLKF-Methoden gilt, wird davon ausgegangen, dass die Fehlerverteilung der Strukturfaktoramplituden einer Gauss-Verteilung entspricht und für die Gesamtgewichtungsfaktoren w_{hkl} wird ein einheitliches Gewicht $w_{hkl} = \frac{1}{\sigma_{hkl}^2}$ verwendet, da die Bestimmung von w_{hkl} für einzelne Observationen äußerst schwierig ist. Dies entspricht der Annahme, dass alle Reflexe mit der gleichen Genauigkeit gemessen worden sind und die Verteilung der Koordinatenfehler für jeden Reflex gleich ist.

Der Unterschied zwischen der LSQF- und der MLKF-Methode liegt im Skalierungsfaktor k begründet ist. Die LSQF-Methode definiert den Skalierungsfaktor k zwischen $|F_{obs}|$ und $|F_{calc}|$ analog Gleichung 2.11 unter Verwendung einer Wilson-Skalierung. Diese Form der Skalierung ist für Proteine jedoch nur näherungsweise korrekt, da davon ausgegangen wird, dass die Atome gleichmäßig in der Elementarzelle verteilt sind und daher F_{obs} langsam mit der Auflösung abfallen müsste. Bei Proteinen kann man allerdings eine klare Unterscheidung zwischen dem Makromolekül und dem umgebenden Lösemittel treffen, was sich in der Verteilung der F_{obs} widerspiegelt.

Bei der MLKF-Methode wird der Skalierungsfaktor k mit Hilfe zweier Gauss-Funktionen genähert, wodurch die negative Korrelation von Protein- und Solvensanteilen Berücksichtigung findet:

$$k = k_0 \cdot e^{-B_0 \cdot |\vec{S}|} \cdot (1 - k_1 \cdot e^{-B_1 \cdot |\vec{S}|}) \quad (2.22)$$

Der Faktor B_1 ist normalerweise so groß, dass er nur die Skalierung der 6 Å oder niedrigerer Auflösung beeinflusst, also in erster Linie den Solvensbereich.

Nach der Bestimmung der globalen Verfeinerungsparameter folgt die eigentliche Verfeinerung unter Verwendung einer Konvolution einer normalen und einer Differenzelektronendichtekarte. Die Dichtekarte wird bei der LSQF-Methode berechnet nach:

$$w \cdot (|F_{obs}| - k \cdot |F_{calc}|) \cdot e^{i \cdot \alpha_{calc}} \quad (2.23)$$

Bei der MLKF-Methode ist die Elektronendichtekarte definiert nach:

$$\frac{m \cdot (|F_{obs}| - D \cdot |F_{calc}|) \cdot e^{i \cdot \alpha_{calc}}}{\Sigma} \quad (2.24)$$

Hierbei ist m der Phasenfehler (*figure of merit*), D ein Maß für den Koordinatenfehler und Σ ein Erwartungswert für die Elektronendichte, bestimmt auf der Grundlage gemessener und nicht gemessener Reflexe. Read (1986) konnte zeigen, dass die Berechnung der Elektronendichtekarten nach Gleichung 2.24 deutlich weniger Modellbehauptung zeigt als die Berechnung nach Gleichung 2.23.

Die Verfeinerung einer makromolekularen Struktur erfordert eine Reihe alternierender Schritte von Verfeinerungsrechnungen und manueller Korrekturen am Modell. Diese Vorgehensweise ist für jede Struktur individuell und unterschiedlich aufwendig.

Von den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfeinerungsprogrammen verwendet SHELX (Sheldrick and Schneider, 1997) die LSQF-Methode und CNS (Brünger et al., 1998) die MLKF-Methode. Bei REFMAC (CCP4, 1994) können beide Methoden eingesetzt werden.

2.2.3 Hochaufgelöste Proteinstrukturen

Atomare Auflösung ist nach Sheldrick (1990) definiert als maximale Auflösung von mindestens 1.2 Å mit mindestens 50 % der Intensitäten größer als 2σ in der äußeren Schale. Die Anzahl makromolekularer Strukturen, die diese Auflösung erreichen, ist bisher sehr begrenzt. So finden sich in der PDB (Bernstein et al., 1977) bisher 158 Einträge (gesamt 12 696) bei dieser oder besserer Auflösung, wobei die meisten Strukturen von kleinen Molekülen (Peptide, Antibiotika etc.) oder kleinen Proteinen (< 10 kDa) stammen und die Datenbank redundant ist. Momentan befinden sich für Proteine mit mehr als 100 Aminosäuren 52 Einträge bei einer Auflösung von 1.2 Å oder besser und 14 Einträge bei einer Auflösung von 1.0 Å oder besser in der PDB.

In naher Zukunft wird die Anzahl bekannter Protein-3D-Strukturen dieser Güte stark anwachsen. Die wesentlichen Gründe hierfür sind die Verbesserung der Detektoren (CCD- und Flächendetektoren hoher Auflösung und Empfindlichkeit), die Verwendung von Synchrotronstrahlung (hohe Intensität und niedrige

Divergenz des Strahls) und die Messung unter Cryobedingungen (geringe Strahlenschäden an den Proteinkristallen).

Atomare Auflösung bietet einige naheliegende methodische Vorteile für Proteinstrukturen. So können die Datensätze automatisch verfeinert werden (Lamzin and Wilson, 1993) oder die Strukturen *ab initio* gelöst werden, wie dies bei *A. australis* Hector Scorpion Toxin (Smith et al., 1997) und Lysozym (Deacon et al., 1998) erfolgreich war. Desweiteren sind die biologisch relevanten Vorteile hoher Auflösung, wie z.B. exaktere und detailliertere Informationen über Reaktionsmechanismen bei Enzymen, Regulation oder Interaktionen, herauszustreichen.

Bei atomarer Auflösung verfeinerte Proteinstrukturen liefern viel detailliertere Proteinmodelle, eine bessere Korrelation zwischen gemessenen und berechneten Strukturparametern wird erreicht und das hohe Daten-zu-Parameter-Verhältnis erlaubt eine wesentlich genauere Bestimmung der atomaren Koordinaten (Dauter et al., 1997). Dies bedeutet, dass man multiple Konformationen erkennen und verfeinern, einzelne Atomtypen (C, N, O, S) unterscheiden, Wasserstoffatome identifizieren, den Protonierungsgrad bestimmen (His, Carboxylatgruppen etc.), spezielle Wasserstoffbrücken analysieren (exakte Konformationsbestimmung von His, Asn und Gln) und anisotrope Temperaturfaktoren verfeinern (Informationen über die korrelierte Bewegung regider Gruppen) kann.

Schlussendlich liefern diese Daten die Möglichkeit bessere Bibliotheken stereochemischer Parameter zu erstellen, da die bisher verwendeten Daten von kleinen Moleküle stammen (Engh and Huber, 1991). Bei hoch aufgelösten Proteinstrukturen konnten jedoch deutliche Abweichungen von diesen Standardwerten beobachtet werden (Validation-Network, 1998).

3 Experimenteller Teil

3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme

3.1.1 Chemikalien und Proteine

Die verwendeten Chemikalien hatten p.a.-Qualität und stammten von den Herstellern Biomol, Fluka, Merck und Sigma. Das Wasser stammte aus einer Reinstwasseranlage und hatte eine Leitfähigkeit von $\Omega^{-1} \leq 50 \mu\text{m} \cdot \text{cm}^{-1}$. Sämtliche verwendete Lösungen wurden durch eine $0.2 \mu\text{m}$ -Membran sterilfiltriert.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme wurden von den Kooperationspartnern in vorgereinigter Form zur Verfügung gestellt. Die R-ADH-Lb wurde von Bettina Riebel vom Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf an der Kernforschungsanlage in Jülich in rekombinanter Form in *E. coli*-Zellen exprimiert und aufgereinigt. Die D-AO-Tv hat Martina Müller von der TU in Braunschweig aus Hefezellen (Stamm: *Trigonopsis variabilis*, DSM 70714) isoliert und aufgereinigt.

3.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Materialien und Geräte sind in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Äkta Explorer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
CD-Spektropolarimeter J-715	Jasco Germany, Gross Umstadt
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems, Oxford, England
Drehanoden (Cu)	
FR 591	Nonius, Delft, Niederlande
Rotaflex RU-200 B	Rigaku, Düsseldorf
<i>Differential Scanning Calorimeter</i>	MicroCal, Northhampton MA, USA
DynaPro-801 (Dynamische Lichtstreuung)	Protein Solutions, Charlottesville VA, USA
ESI-MS LCQ (T)	Finnigan MAT, Bremen
Flächenzähler	
DIP-2030H	MAC Science, Yokohama, Japan
MAR 345	MAR Research, Hamburg
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala, Schweden
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Monochromatoren	
MAC-XOS Doppelspiegel	MAC Science, Yokohama, Japan
CMF12-38Cu6 Doublemirror	Osmic, Northwood MI, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phast Elektrophoresesystem	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pipettierautomat Multiprobe 104	Packard, Meriden CT, USA
Reinstwasseranlage	Serlapur
Spektralphotometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan
Waagen	
Analysenwaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
Zentrifugen	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3.2: Sonstige Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
Bradford-Kit	BioRad, München
Celluloseacetatfilter 0.2 μm	Satorius, Göttingen
Celluloseacetatfilter 0.02 μm	Whatman, Maidstone, England
Cryoloops	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt
Linbro-Schalen	Hampton Research, Laguna Niguel CA, USA oder ICN, Eschwege
Markröhrchen (0.1–1 mm \varnothing)	Hilgenfeld, Malsfeld
MonoQ HR5/5 und 10/10 (Anionenaustausch)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PhastGel Gradient 8-25 %	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PhastGel IEF pH 2.5-6	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PhastGel IEF pH 3-9	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Phenyl Superose HR5/5 (hydrophobe Interaktion)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Superdex 200 HR10/30 (Gelfiltration)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ultrafiltration	
Centricon-10 und -30	Millipore, Eschborn
Centriprep-10, -30 und -50	Millipore, Eschborn

Tabelle 3.3: EDV-Systeme.

Rechner und Betriebssystem	Hersteller
Indigo2 mit Irix 6.5	Silicon Graphics (SGI), München
Octane mit Irix 6.5	
O2 mit Irix 6.5	
HP Apollo 700 mit HP-UX	Hewlett Packard, Böblingen
IBM-kompatibler PC mit RedHat Linux und Windows98	Schönsee Loose Datentechnik, Köln
Drucker:	
HP LJ 5MP	Hewlett Packard, Böblingen
HP LJ 4500N	Hewlett Packard, Böblingen

3.1.3 Programme und Programmpakete

3.1.3.1 Das HKL-Paket

Programmpaket zur Prozessierung und Auswertung von Film- und Bildspeicherplattendaten (Otwinowski and Minor, 1997).

DENZO	Bestimmung der Kristallorientierung, Indizierung der Reflexe, Festlegung der Elementarzelle, Berechnung der integralen Reflexintensität und Reflexpartialität, Verfeinerung der geometrischen Parameter der Messung (Detektor- und Kristallparameter)
XDISPLAYF	Visualisierung der Rohdaten und des Prozesses der Datenintegration
SCALEPACK	Skalierung durch Berechnung einzelner, isotroper Skalierungs- und B-Faktoren

3.1.3.2 Collaborative Computing Project Number 4 (CCP4)

CCP4 (CCP4, 1994) ist ein umfassendes Programmpaket für alle Bereiche der Proteinkristallographie. Die folgenden Programme aus der CCP4-Sammlung (Versionen 3.5 und 4.0) wurden verwendet:

AMORE	Das Programmpaket enthält eine Sammlung von Routinen für alle Rechnungen zum Molekularen Ersatz.
BAVERAGE	Berechnung der Mittelwerte der Temperaturfaktoren (B) von Haupt- und Seitenkettenatomen
CAD	Zusammenfassen und sortieren von Röntgendaten aus verschiedenen Dateien und Generierung eines neuen Datensatzes
CONTACT	Berechnung verschiedener Kontakttypen in Proteinstrukturen
FFT	Elektronendichtekarten- und Strukturfaktorberechnung mit Hilfe des Fast-Fourier-Transform Algorithmus
HGEN	Generierung von H-Atompositionen für Proteine
HKLVIEW	X-Windowsprogramm zur Darstellung von Pseudo-Präzessionsaufnahmen
MAKEDICT	Konvertierung von PDB-Dateien in TNT- oder PROTIN-Lexika und von PROTIN-Lexika in PDB-Dateien
MAPMASK	Manipulation von Elektronendichtekarten
MATHEWS_COEF	Berechnung des Matthews-Koeffizienten und des Wassergehalts von Proteinkristallen
MTZ2VARIOUS	Konvertierung von Röntgendaten im MTZ-Format in verschiedene andere Datenformate (z.B. X-PLOR/CNS, SHELX, ASCII etc.)
MTZDUMP	Ausgabe von Daten (Header, Auflösungsbereich, Reflexwerte etc.) aus Röntgendatendateien im MTZ-Format
MTZTONA4	Umwandlung von Reflexdateien im MTZ-Format in ASCII-Dateien und umgekehrt
PDBSET	Verschiedene Manipulationen an PDB-Koordinatendateien
PEAKMAX	Peaksuche in Elektronendichtekarten

POLARRFN	Berechnung der Rotationsfunktion unter Verwendung von Polarkoordinaten
PROCHECK	Programmpaket zur Validierung der stereochemischen Qualität von Proteinstrukturen (Laskowski et al., 1993)
PROTIN	Generierung einer <i>Restraint</i> -Datei für REFMAC
REFMAC	Programm zur makromolekularen Verfeinerung
SCALEPACK2MTZ	Konvertierung von SCALEPACK-Ausgabedateien in MTZ-Dateien
SFALL	Strukturfaktorberechnung und kristallographische Verfeinerung unter Verwendung mit FFT in beiden Richtungen
SFHECK	Programm zur Bewertung der Übereinstimmung zwischen atomarem Modell und Röntgendaten (Vaguine et al., 1999)
TRUNCATE	Umrechnung von Reflexintensitäten in Strukturfaktoramplituden und Berechnung eines B-Faktors aus einem Wilson-Plot (French and Wilson, 1978)
UNIQUE	Generierung einer Liste einmaliger Reflexe, z.B. zur Definition freier Reflexe für die Kreuzvalidierung
WATPEAK	Selektion von Peaks der PEAKMAX-Ausgabe und nahe Positionierung an den entsprechenden Proteinatomen, die als Wasserstoffbrückenakzeptoren oder -donatoren in Frage kommen
XDLMAPMAN	X-Windowsprogramm zur Manipulation, Analyse und Reformatierung von Elektronendichtekarten
XLOGGRAPH	Graphische Darstellung von Datentabellen aus Protkolldateien von CCP4-Programmen

3.1.3.3 EPMR

EPMR (Kissinger et al., 1999) ist ein Programm für den kristallographischen Molekularen Ersatz unter Verwendung eines evolutionären Suchalgorithmus. Das Programm verfeinert die drei Rotations- und Translationsparameter bezüglich des Korrelationskoeffizienten zwischen F_o und F_c . Am Ende der Optimierung wird eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt.

3.1.3.4 X-PLOR und CNS

X-PLOR (Brünger, 1992b) war ursprünglich ein Programmsystem zur Verfeinerung von Kristallstrukturen mittels Energieminimierung und Moleküldynamik. Die hier verwendete Version 3.8 enthält darüber hinaus alle notwendigen Routinen für den Molekularen Ersatz und für die Strukturbestimmung aus Daten, die mittels NMR-Spektroskopie gewonnen wurden.

Crystallography & NMR System (CNS, Version 1.0) (Brünger et al., 1998) ist eine Weiterentwicklung des X-PLOR-Programmpaketes, wobei der überwiegende Teil der Routinen neu geschrieben wurde. Das Programmpaket ermöglicht über die aus X-PLOR bekannten Funktionen die Suche nach Schweratompositionen, Bestimmung experimenteller Phasen (MAD und MIR), Dichtemodifikation und kristallographische Verfeinerung unter Verwendung von *Maximum Likelihood*-Algorithmen.

Zu Beginn der Arbeit wurde X-PLOR verwendet, da CNS erst seit 1999 zur Verfügung stand.

Es kamen folgende CNS-Skripte zur Anwendung, die je nach Bedarf verändert wurden:

alternate.inp	Generierung von multiplen Konformationen
bfactor_plot.inp	Berechnung der Mittelwerte der Temperaturfaktoren (B) der Haupt- und Seitenkettenatome
generate.inp	Generierung der Topologiedateien
minimize.inp	konjugierte Gradientenverfeinerung
model_map.inp	Berechnung von Elektronendichtekarten
model_stats.inp	Validierung und Statistik eines kristallographischen Strukturmodells
optimize_rweight.inp	Berechnung des Gewichtungsfaktors zwischen Röntgen- termen und B-Faktor Restriktionen
optimize_wa.inp	Berechnung des Gewichtungsfaktors zwischen Röntgen- termen und geometrischen Restriktionen
refine.inp	Kombination von Moleküldynamik, Energieminimie- rung, B-Faktor-Verfeinerung und Berechnung von Elek- tronendichtekarten

sa_omit_map.inp	<i>Simulated Annealing</i> und Berechnung einer Elektronendichtekarte mit einer sphärisch ausgelassenen fraglichen Region in der Struktur (<i>omit map</i>)
water_pick.inp	Suche nach Wassermolekülen

3.1.3.5 REPLACE

Dieses Programmpaket (Tong and Rossmann, 1997) berechnet Rotations- (GLRF) und Translationsfunktionen (TF) im direkten Raum. Außerdem ist es in der Lage die sogenannte *Locked Rotation Function* zu berechnen. Hierbei werden Informationen über die nichtkristallographische Symmetrie in das Berechnungsverfahren einbezogen. Es wurde die Version 3.4 verwendet.

3.1.3.6 SHELX-97

Das Programmpaket SHELX war ursprünglich für die Verfeinerung von Kleinmolekülstrukturen entwickelt worden. Die hier verwendete Version SHELX-97 (Sheldrick and Schneider, 1997) umfasst auch eine Reihe von Routinen zur Verfeinerung hoch aufgelöster makromolekularer Strukturen auf Basis von *Least Square*-Algorithmen (LSQF). Weiterhin sind Werkzeuge zur Elektronendichteberechnung und zur Strukturvalidierung implementiert:

SHELXL	Strukturverfeinerung von Makromolekülen bei hohen Auflösungen (maximale Auflösung 2.5 Å oder besser)
SHELXPRO	Interaktive Schnittstelle zwischen SHELXL und anderen Programmen
SHELXWAT	Automatische Wasservorhersage für Makromoleküle

3.1.3.7 Grafikprogramme

BRAGI	Dreidimensionale Darstellung und Modellierung von Proteinstrukturen; Version 5.0 (Schomburg and Reichelt, 1988)
-------	---

O	Dreidimensionale Darstellung von Protein- und Kristallstrukturen, Interpretation von Elektronendichtekarten, Manipulations- und Darstellungsprogramme; Version 6.0.5 und 7.0 (Jones et al., 1991)
SPDBV	Der Swiss-PDBViewer ermöglicht die Analyse und Modifikation mehrerer Proteinstrukturen zur selben Zeit (Guex and Peitsch, 1997)

3.1.3.8 Sonstige Einzelprogramme

CONTIN	Auswertung von CD-Spektren (Provencher and Glöckner, 1981)
K2D	Auswertung von CD-Spektren (Andrade et al., 1993)
SELCON	Auswertung von CD-Spektren (Sreerama and Woody, 1993)
DSSP	Berechnung von Sekundärstrukturelementen aus 3D-Strukturkoordinaten (Kabsch and Sander, 1983)
PREDATOR	Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen aus Proteinsequenzen (Frishman and Argos, 1996)
STAMP	Strukturalignment von mehreren Proteinen (Russell and Barton, 1992)
BOBSCRIPT	Erweiterung zum Programm MOLSCRIPT u.a. zur graphischen Darstellung von Elektronendichtekarten (Kraulis, 1997)
MOLSCRIPT	Programm zum Erstellen von schematischen oder detaillierten Grafiken von 3D-Strukturkoordinaten (Kraulis, 1997)
RASTER3D	Programmpaket für die Erstellung von Eingabedateien für die graphische Wiedergabe von PDB-Koordinaten (Merritt and Murphy, 1994) Verwendete Unterrouinen: RASTEP, RENDER
SHOWCASE	Bearbeitung und Beschriftung von Bilddateien auf SGI-Workstations

SNAPSHOT	Erstellung von Abbildungen einer Bildschirmausgabe auf SGI-Workstations
GNUPLOT	Erstellen von XY-Grafiken aus Datenreihen im ASCII-Format (Williams and Kelley, 1996)
XFIG	Programm zum Zeichnen und zum Beschriften von Abbildungen (siehe A.2)
LATEX	L ^A T _E X ist ein Textsatzsystem, mit dem diese Arbeit erstellt wurde (Lamport, 1985)
XPRESS	Steuersoftware für eine Röntgenanlage der Fa. Nonius, Delft, Niederlande
DYNAMICS	Auswertung von Dynamischen Lichtstreuemessungen; Version 3.0 (siehe A.2)

Im Anhang A.2 sind eine Reihe von Internetseiten zusammengefasst, die unter anderem die Dokumentationen verwendeter Programme enthält.

3.2 Proteinreinigung

Die Proteinexpression und die Vorreinigung der verwendeten Proteine wurden für die R-ADH-Lb (Riebel, 1996) und für die D-AO-Tv (Müller, 2000) von den Kooperationspartnern durchgeführt und ist in den zitierten Arbeiten beschrieben.

3.2.1 Chromatographische Verfahren

Alle chromatographischen Trennungen wurden entweder mit einer EDV-gesteuerten FPLC- oder einer Äkta-Anlage durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme wurden vom Kooperationspartner in bereits vorgereinigter Form zur Verfügung gestellt. Für die Endreinigung dieser Enzyme eignete sich am besten die Methode der Anionenaustauschchromatographie. Es wurden je nach Probengröße MonoQ-Säulen verschiedener Volumina (HR 5/5 und HR 10/10) der Fa. Pharmacia verwendet. Die Trennmatrix dieser Säulen besteht aus hydrophilen Polyetherkügelchen, die mit quartären Aminogruppen substituiert sind.

Im Folgenden sind die Bedingungen für die Endreinigung der R-ADH-Lb und der D-AO-Tv zusammengestellt.

R-ADH-Lb

Puffer A:	50 mM HEPES pH 7.0, 1 mM MgCl ₂
Puffer B:	50 mM HEPES pH 7.0, 1 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl
Gradient:	kontinuierlich von 0 bis 100 % Puffer B in 20 Säulenvolumen
Detektion:	280 nm
Fraktionen:	1–5 ml
Temperatur:	10°C

D-AO-Tv

Puffer A:	50 mM Glycylglycin pH 5.5
Puffer B:	50 mM Glycylglycin pH 4.0
Gradient:	kontinuierlich von 0 bis 100 % Puffer B in 20 Säulenvolumen
Detektion:	280 nm, 455 nm
Fraktionen:	1–5 ml
Temperatur:	4°C

3.2.2 Aufkonzentrierung und Umpufferung

Die aufgereinigten Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mussten aufkonzentriert und umpuffert werden, da für die Kristallisation Konzentrationen von mehreren mg/ml erforderlich sind und zu hohe Salzkonzentrationen stören. Dafür wurden die Ultrazentrifugationsröhrchen Centriprep und Centricon mit verschiedenen Porengrößen verwendet.

R-ADH-Lb

Porengröße:	10 kDa
Puffer:	20 mM HEPES pH 7.0, 1 mM MgCl ₂
Temperatur:	10°C

D-AO-Tv

Porengröße:	30 kDa
Puffer:	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 20 mM NaCl, 30 mM Saccharose, 1 μ M FAD
Temperatur:	4°C

Anschließend wurden die Proben mit einem 0.2 μ m-Filter sterilfiltriert.

3.3 Analytik

3.3.1 Aktivitätstests

3.3.1.1 R-ADH-Lb

Alkoholdehydrogenasen setzen Ketone bzw. sekundäre Alkohole unter Zuhilfenahme des Kosubstrates NADPH bzw. NADP um. Die Richtung der reversiblen Reaktion hängt von der Zugabe der Kosubstratform (reduziert oder oxidiert) und des Substrates ab. Darüber hinaus tendieren Alkoholdehydrogenasen auf Grund von thermodynamischen Gesichtspunkten zur Bevorzugung einer der beiden Reaktionen.

Die Aktivitätsbestimmung beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme der Extinktion von NADPH bei 340 nm. Durch Zugabe eines Ketons (Acetophenon) als Substrat der R-ADH-Lb sowie NADPH wurde der Verbrauch von NADPH und der damit verbundene Umsatz des Ketons zum sekundären Alkohol photometrisch detektiert.

Testansatz:

Acetophenon:	970 μ l einer 11 mM Lösung in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (\cong 10.67 mM im Test)
NADPH:	20 μ l einer 9.55 mM Lösung in 10 mM Tris/HCl pH 8.5 (\cong 0.19 mM im Test)
Enzymlösung:	10 μ l

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und eine Minute bei 30°C photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt.

Die Berechnung der Aktivität in U/ml erfolgte über das Lambert-Beer'sche Gesetz (ϵ_{NADPH} : $6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}^{-1}$).

3.3.1.2 D-AO-Tv

D-Aminosäureoxidasen setzen D-Aminosäuren unter Zuhilfenahme von FAD zu α -Ketosäuren um. Das bei der Reaktion entstehende H_2O_2 kann durch eine Peroxidase reduziert werden, während gleichzeitig ein Reduktionsäquivalent oxidiert wird. Verwendet man o-Dianisidin als Reduktionspartner (Fischer et al., 1996), so entsteht bei der Oxidation des Chromogens ein brauner Farbstoff, der im Sauren rot wird und bei 540 nm photometrisch detektiert werden kann.

Testansatz:

o-Dianisidin:	250 μl einer Lösung aus 210 mg o-Dianisidin, 3000 U Peroxidase, 50 ml MQ, 50 ml Glycerin
D-Alanin:	350 μl einer 20 mg/ml-Lösung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.0
Puffer:	380 μl Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8.0)
Enzymlösung:	20 μl

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet, 30 bis 300 sec bei 30°C verfolgt und durch Zugabe von 500 μl 30 %iger (w/v) Schwefelsäure abgestoppt. Die Berechnung der Enzymaktivität wurde über eine Kalibrierung mit H_2O_2 (0.01-0.1 mM) durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wurde das Bradford-Kit der Fa. BioRad verwendet (Bradford, 1976). Dabei wurden 4-28 μg (≈ 40 -280 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Protein auf 20 μl verdünnt und mit 1 ml 1:5-verdünntem Färbereagenz versetzt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorbanz bei 595 nm gegen MQ-Wasser gemessen und mit einer BSA-Standardkurve verglichen.

3.3.3 Elektrophorese

Zur SDS-Gelelektrophorese wurde das Elektrophoresesystem Phast und die vorgefertigten SDS-Gele (8-25 % Acrylamid) der Fa. Pharmacia verwendet. Die Proteinlösungen wurden mit Wasser auf eine Konzentration von etwa 0.1 mg/ml verdünnt, mit dem Auftragspuffer (4×: 8 ml 60 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 g SDS, 4 mg Bromphenolblau, 2 ml β -Mercaptoethanol) vermischt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Trennung wurde nach dem Pharmacia *Seperation Technique File No. 110* durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die Proteine mit einer Silberfärbung angefärbt (Pharmacia *Development Technique File No. 210*). Als Größenmarker wurde die Proteinstandardmischung IV von Pharmacia verwendet: Cytochrome C 12 300 Da, Myoglobin 16 949 Da, Carboanhydrase 30 000 Da (Doppelbande), Ovalbumin 42 700 Da, Albumin 66 250 Da, Ovotransferin 78 000 Da.

3.3.4 Proteasetest

Ein Test von Proteinproben auf Proteaseaktivität wurde von Chavira et al. (1984) beschrieben. Der Test beruht auf der proteolytischen Spaltung von Azocoll, einem wasserunlöslichen Kollagenderivat, welches mit einem hellroten Azofarbstoff angefärbt ist. Durch die Proteolyse wird der Farbstoff freigesetzt und kann photometrisch nachgewiesen werden. Es können selbst geringste Mengen an Proteaseaktivität, die weder durch elektrophoretische Methoden noch durch massenspektrometrische Methoden detektiert werden können, nachgewiesen werden.

Azocollsuspension	1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM CaCl ₂ , Spatelspitze Azocoll
→	heftig vortexen
→	450 μ l Azocollsuspension mit 20 μ l Proteinlösung (~ 1.5 mg/ml) mischen
→	Inkubation: 2–5 h bei 30°C
→	Extinktion bei 520 nm messen

Zusätzlich zu den Proteinproben wurden parallel Blindproben ohne Proteinlösung inkubiert, die als Referenz bei der Extinktionsmessung dienten.

3.3.5 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen sind eine sensitive Methode zur Molekulargewichtsbestimmung und Reinheitskontrolle von Proteinproben. Dabei kann mit den hier verwendeten Methoden ESI-MS und MALDI-TOF-MS eine Auflösung von ca. ± 1 au respektive ± 10 au in einem Massenbereich bis 100 kDa erreicht werden.

Für diese Analysen ist es notwendig, die Proteinproben möglichst vollständig zu entsalzen. Die Konzentration der Proteinproben sollte bei etwa 100 pmol/ μ l liegen.

ESI-MS:

Proteinprobe	nach Methanol:Wasser (1:1) mit 0.1 % (w/v) Essigsäure umpuffern
→	Endkonzentration 10 pmol/ μ l ($\sim 100 \mu$ l)

MALDI-MS:

Proteinprobe	nach 0.1 % TFA umpuffern
→	Endkonzentration 10-100 pmol/ μ l ($\sim 100 \mu$ l)
→	davon 5 μ l mit 15 μ l 0.1 % TFA und 30 μ l Sinapinsäure gesättigt in 0.1 % TFA in Acetonitril:Wasser 1:2 mischen
Targetpräparation	Spots mit einer Ethanol-Dünnschicht (0.5 μ l gesättigte Sinapinsäure in Ethanol) benetzen und trocknen lassen
→	0.5 μ l Probe auf den Spot pipettieren
→	Target trocknen lassen und danach sofort vermessen
Standards	Trypsinogen (23 981.9 Da), Carbonic Anhydrase (29 025.7 Da), BSA (66 413.0 Da) (externe Kalibrierung)

3.3.6 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung wird der durchschnittliche hydrodynamische Radius einer Proteinprobe gemessen. Über diesen Wert lassen sich Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Partikel und den Aggregationsgrad der Probe ziehen. Da die Homogenität einer Proteinlösung entscheidend für die Kristallisationsneigung eines Proteins ist, sind diese Analysen von enormer Bedeutung in der Proteinkristallographie. Es wurde das Gerät DynaPro-801 der Fa. ProteinSolutions verwendet.

Testansatz:

Proteinprobe	0.1-10 mg/ml (entsprechend der gewünschten Konzentration im Kristallisationsansatz); ca. 25 μ l 0.2 μ m sterilfiltriert
Messung	ca. 20 <i>Scans</i>
Auswertung	mono- oder bimodal, je nach Anzahl der Aggregate in der Lösung

3.3.7 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie kann zur Bestimmung von Sekundärstrukturgehalten in Proteinen verwendet werden. Neben den Sekundärstrukturanteilen können auch Denaturierungen durch Temperaturveränderungen, pH-Verschiebungen oder andere Substanzen (z.B. Harnstoff) detektiert werden.

3.3.7.1 Messen von CD-Spektren

Für die Messungen wurden die Proteinproben im Centricon 30 (Fa. Millipore) in 5 mM Phosphatpuffer pH 7.5 umgepuffert (die R-ADH-Lb-Proben enthielten zusätzlich 1 mM MgCl_2). Es wurden jeweils Proteinkonzentrationen von 0.1–0.2 mg/ml verwendet. Die Messungen fanden bei folgenden Standardbedingungen statt:

Wellenlängenbereich:	185–250 nm
Auflösung:	0.1 nm
Geschwindigkeit:	50 nm/min
Akkumulationen:	10 Spektren
Bandweite:	1 nm
Temperatur:	20°C
Stickstofffluss:	5 l/min.

Zur Auswertung wurden die Programme CONTIN (Provencher and Glöckner, 1981), K2D (Andrade et al., 1993) und SELCON (Sreerama and Woody, 1993) verwendet.

3.3.7.2 Schmelzkurven

Für die Schmelzkurven wurden mit den folgenden Einstellungen flache Temperaturgradienten gefahren:

Wellenlänge:	222 nm
Auflösung:	0.1 nm
Temperaturgradient:	40°C/h
Stickstofffluss:	5 l/min

3.4 Kristallisation

3.4.1 Allgemein

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Kristallisationsversuche als ‘sitzender Tropfen’ in Linbro-Platten (Fa. ICN oder Hampton Research) auf Polystyrol- und Polypropylen-Brücken (Fa. Crystal Microsystems) nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Der Tropfen wurde aus Proteinlösung, Reservoir und gegebenenfalls Additiven gemischt. Die Ergebnisse wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop mit Polarisationsfilter untersucht und protokolliert.

Die Reservoirs wurden überwiegend von Hand gemischt, wenn anders vermerkt auch mit einem Pipettierroboter, der über eine im Institut entwickelte Software

gesteuert wurde (Schröder, 1997). Beim Ansetzen dieser Lösungen wurde mit der Logik des Pipettierroboters verfahren: Der pH-Wert des Puffers wurde in einer 500 mM oder 1 M Pufferlösung eingestellt, die dann mit den anderen Komponenten gemischt wurde. pH-Effekte der anderen Salze wurden vernachlässigt, da die Reproduzierbarkeit, weniger aber der genaue pH-Wert von Interesse war. Bei der Angabe der Kristallisationsbedingungen handelt es sich immer um eine Beschreibung des Reservoirs, da auch die Lösung, in der das Protein vorliegt, den Endzustand im Tropfen beeinflusst.

3.4.2 R-ADH-Lb

Die allgemeinen Kristallisationsbedingungen der R-ADH-Lb sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Temperatur:	20°C
Konzentration:	15 mg/ml
Puffer der Protein- stammlösung:	20 mM HEPES pH 7.0, 1 mM MgCl ₂
Additive:	3–25 mM NADP, 15–50 mM Acetophenon
Methode:	sitzender und hängender Tropfen
Tropfenvolumen:	2–5 µl Proteinlösung + 2–5 µl Reservoir
Reservoirvolumen:	1 ml

3.4.3 D-AO-Tv

Die allgemeinen Kristallisationsbedingungen der D-AO-Tv sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Temperatur:	20°C
Konzentration:	6.75 mg/ml
Puffer der Protein- stammlösung:	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 μ M FAD, 20 mM NaCl, 30 mM Saccharose, 3 mM EDTA, 35 μ g/ml PMSF, 0.7 μ g/ml Pepstatin A, 0.5 μ g/ml Leupetin
Additive:	1 mM α -D,L-Hydroxyoctansäure
Methode:	sitzender und hängender Tropfen
Tropfenvolumen:	2–5 μ l Proteinlösung + 2–5 μ l Reservoir
Reservoirvolumen:	1 ml

3.4.4 Impfkristallisation

Auf Grund der zum Teil langen Wachstumszeiten der Kristalle und zur Züchtung kompakterer Kristalle wurden, neben den normalen Kristallisationsansätzen, Impftechniken (*seeding*) verwendet. Dabei wurden die Kristallisationsbedingungen so gewählt, dass die Fällungsmittelkonzentrationen keine Kristallkeimbildung mehr zuließen, vorhandene Kristalle sich jedoch nicht auflösten und weiterwachsen konnten (Fällungsmittelkonzentrationen um 5 bis 20 % verringert). Zur Herstellung der Impfkeime wurden kleine verwachsene Kristalle mechanisch zerstört und um den Faktor 300 bis 2400 mit Reservoirlösung verdünnt. Den Reservoirlösungen der R-ADH-Lb wurde zusätzlich NADP sowie Acetophenon (siehe 3.4.2) und den Reservoirlösungen der D-AO-Tv wurde α -D,L-Hydroxyoctansäure (siehe 3.4.3) zugefügt.

Die Impfkristallisationsansätze wurden vor der Zugabe der Impfkeime (je 0.5 μ l pro Tropfen) 24 h voräquilibriert.

3.4.5 Dokumentation der Kristallisation

Für die Dokumentation der Kristallisationsbedingungen sind zwei verschiedene Möglichkeiten denkbar. Die erste Möglichkeit ist die Protokollierung der Anfangsbedingungen, d.h. die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten und deren pH-Werte sowie die eingesetzten Volumina. Die zweite Möglichkeit ist die Dokumentation der eigentlichen Kristallisationsbedingungen, d.h. die wesentlichen Lösungseigenschaften, unter denen das System eine Grenze im

Phasendiagramm erreicht und eine kristalline Phase ausbildet. Diese Parameter sind jedoch aus den Anfangsbedingungen des Kristallisationsexperimentes nur ungenau und vage abschätzbar.

In der Praxis kommt es auf die Reproduzierbarkeit der Kristallisationsbedingungen an. Daher erfolgte die Dokumentation nach der ersten Methode. Dabei muss ferner betrachtet werden, dass es sich bei den angegebenen Werten um typische Beispiele handelt, da die Parameter, die die Kristallisation beeinflussen, einen mehr oder weniger großen Spielraum haben.

3.5 Röntgendiffraktometrie

3.5.1 Kristallmontage

Für Messungen bei 4°C wurden die Kristalle aus der Lösung, in der sie gewachsen waren, in ein der Größe der Kristalle angepasstes Markröhrchen (0,5–1,0 mm Ø, Fa. Hilgenberg) gesogen. Mit einer dünneren Kapillare (0,1 mm Ø) wurde die Mutterlauge um den Kristall herum abgesaugt. Zur Beibehaltung einer feuchten Atmosphäre wurde etwas Flüssigkeit in kurzem Abstand zum Kristall gelassen. Die Kapillare wurde an beiden Enden mit einem niedrigschmelzenden Wachs versiegelt und mit Knetgummi auf dem Goniometerkopf montiert.

Zur Tieftemperaturmessung wurden die Kristalle mit einem *Cryoloop* aus dem Reservoir in einen Stickstoffstrom mit einer Temperatur von 100 K überführt, sofern es sich bei dem verwendeten Reservoir schon um eine Cryolösung handelte. In anderen Fällen wurden die Kristalle zunächst für einige Sekunden in ein Reservoir, das zusätzlich zu den Fällungsmittelkomponenten noch ein Frostschutzmittel enthielt, überführt und anschließend im Stickstoffstrom montiert.

3.5.1.1 Röntgenaufnahmen

Röntgenaufnahmen am hauseigenen Röntgenmessplatz wurden mit einer Kupfer-Drehanode durchgeführt (Cu K_α -Strahlung) und das Beugungsmuster wurde auf einer Bildspeicherplatte aufgezeichnet (dip2030H). Die Steuerung der Messung erfolgte mit dem Programm XPRESS. Folgende Einstellungen wurden

standardmäßig bei den Messungen gemacht:

Spannung	45 kV
Stromstärke	100 mA
Wellenlänge	1.5418 Å
Detektorabstand	110-250 mm
Monochromator	Graphitkristall oder Doppelspiegel
Rotationswinkel	0.5-1°/Bild
Belichtungszeit	1200 sec/Bild
Kollimator	0.5 mm

Die Messungen mit Synchrotronstrahlung am DESY in Hamburg wurden an der *Beamline* BW7B (Multipol Wiggler, DORIS-Speicherring) durchgeführt. Die Daten wurden mit einer MAR345 Bildspeicherplatte aufgezeichnet. Die Steuerung der Messung erfolgte mit dem Programm MAR345. Folgende Einstellungen wurden standardmäßig bei den Messungen gemacht:

Messmodus	Dosis
Wellenlänge	0.8439 Å
Detektorabstand	125-520 mm
Monochromator	Vorspiegel, Dreiwinkelmonochromator und gekrümmter Spiegel
Rotationswinkel	0.5-1°/Bild
Belichtungszeit	10-300 sec/Bild
Kollimator	0.3 mm

3.6 Reduktion der Rohdaten

Für die Auswertung der Röntgenaufnahmen wurden die folgenden Computerprogramme verwendet:

Indizierung, Integrierung	DENZO
Visualisierung der Beugungsbilder	XDISPLAYF
Skalierung	SCALEPACK
Packungsdichte, Mutterlaugenanteil	MATTHEWS_COEFF
Rotationsfunktionen	GLRF
Sortieren von Datenreihen	SORTMTZ
Konvertieren von Datenreihen und Dateien	SCALEPACK2MTZ, MTZ2VARIOUS
Kreuzvalidierung (Definition freier Reflexe)	UNIQUE

3.7 Molekularer Ersatz

3.7.1 Suchmodelle

Als Startmodell für den Molekularen Ersatz diente im Falle der R-ADH-Lb die Struktur der 3- α -20- β -Hydroxysteroiddehydrogenase in der Holoform mit einer maximalen Auflösung von 2.64 Å (PDB-Kürzel 2HSD) (Ghosh et al., 1994). Das Modell wurde für die Rechnungen auf ihr Poly-Alanin-Grundgerüst reduziert und sämtliche Heteroatome (Wasser, NAD) gelöscht.

Für die Aufklärung der Struktur der D-AO-Tv wurden die Struktur der D-AO aus der Schweineniere mit einer maximalen Auflösung von 2.6 Å verwendet (PDB-Kürzel 1kif) (Mattevi et al., 1997). Die Modellkoordinaten wurden dabei – basierend auf einem multiplen Sequenzalignment – in den unähnlichen Sequenzregionen auf ihr Poly-Alanin-Gerüst reduziert und alle Heteroatome (Wasser, FAD, Benzoesäure) gelöscht.

3.7.2 Kombinierte Rotations- und Translationssuche

Das Programm EPMR (Kissinger et al., 1999) führt alle notwendigen Schritte für den Molekularen Ersatz nach einem evolutiven Suchalgorithmus aus. Dabei wird für einen Satz von zufälligen Lösungen generiert (drei Rotations- und drei Translationsparameter) und die Korrelationskoeffizienten zwischen F_o und F_c berechnet. Aus den besten Lösungen wird ein neuer Satz von zufälligen Rotationswinkeln und Translationen berechnet und wiederum die Korrelationsko-

effizienten berechnet. Dieser Prozess wird mehrmals wiederholt. Am Ende der Optimierung wird eine Starre-Körper-Verfeinerung durchgeführt.

3.7.3 Rotationssuche

X-PLOR (Brünger, 1992b) verwendet eine konventionelle Rotationssuche im „Patterson Raum“. Dabei werden zwei Pattersonfunktionen gegeneinander rotiert. Die stationäre „Patterson Karte“ P_2 wird aus den gemessenen Intensitäten durch eine schnelle Fourier Transformation in einem spezifizierten Gitter berechnet. Die zu rotierende „Patterson Karte“ P_1 wird aus dem Suchmodell berechnet. Für jede Orientierung wird eine Produktfunktion $R(M) = \langle P_1 \cdot P_2 \rangle$ berechnet. Bei dieser Mittelwertbildung wird über alle Vektoren in P_1 innerhalb einer Kugelschale summiert. Der jeweils zugehörige Wert von P_2 wird durch lineare Interpolation aus den Nachbarintervallen ermittelt.

CNS (Brünger et al., 1998) bietet neben der Möglichkeit der Rotationssuche im direkten Raum die *Direct Rotation Function* an. Dabei bedeutet *direct*, dass direkt mit den Strukturfaktoramplituden - also im reziproken Raum - gesucht wird und ein Korrelationskoeffizient zwischen berechneten und gemessenen Strukturfaktoren berechnet wird. Die Pattersonsuche im direkten Raum ist die schnellste Methode, es können aber mögliche Lösungen fehlen, da nicht alle Pattersonvektoren in die Suche einbezogen werden. Die *Direct Rotation* Methode ist genauer, benötigt jedoch wesentlich mehr Zeit, da für jede Rotationsorientierung eine Fouriertransformation berechnet werden muss. Eine zeitsparendere Methode verwendet ein initiales grobes Raster und führt anschließend eine genauere Suche um die höchsten Peaks der initialen Suche durch (*Fast Direct Rotation Search*).

Die Rotationslösungen aus X-PLOR und CNS wurden vor der Translationssuche noch einmal in einer PC-Verfeinerung verfeinert. Dadurch können die signifikanten Rotationslösungen besser identifiziert werden (siehe Abschnitt 2.2.2.8).

3.7.4 Translationssuche

X-PLOR führt eine Translationssuche durch Berechnung der Zielfunktion $1 - \frac{E_{XREF}}{W_A}$ (E_{XREF} : effektive Energie, W_A : Gewichtungsfaktor) mit der

Möglichkeit der Verwendung verschiedener *Targets* (Standard: RESIdual) durch. Die Translationssuche mit CNS bietet neben den bekannten *Targets* die Möglichkeit der Verwendung des *fastf2f2-Targets*, was die Suche um den Faktor 100 bis 500 beschleunigt, jedoch sehr viel Speicher benötigt.

An die Translationssuche wurde eine Starre-Körper-Verfeinerung angeschlossen.

3.7.5 Fouriertransformation

Strukturfaktoren, Elektronendichte- oder Pattersonkarten wurden mit Fouriertransformationsroutinen berechnet. Jedes der zur Verfeinerung verwendeten Programmpakete (CCP4 (FFT, PROLSQ), X-PLOR/CNS und SHELX-97) bietet derartige Routinen an. Mit Ausnahme von SHELX-97 (Sheldrick and Schneider, 1997) (und wahlweise bei X-PLOR), das jeden Strukturfaktor normal aufsummiert, benutzen die Programme *Fast Fourier Transform* Algorithmen.

Die von CCP4 und X-PLOR/CNS berechneten Elektronendichten wurden mit dem Programm XDLMAPMAN (CCP4) in für O (Jones et al., 1991) lesbare Dateien im BRIX-Format konvertiert. SHELX-97 bietet dafür die Unteroutine SHELXPRO an.

Für erste Elektronendichten nach dem Molekularen Ersatz wurden $3F_o2F_c$ -Dichtekarten und für spätere Verfeinerungsschritte $2F_oF_c$ -Dichtekarten verwendet, da bei diesen die gemessene Strukturfaktoren aufgrund besserer Phasen höher gewichtet werden. Desweiteren wurden zur Visualisierung der Unterschiede zwischen Modell und zu untersuchender Struktur F_oF_c -Dichtekarten berechnet.

3.8 Computergrafik

Mit interaktiver Computergrafik wurden Molekülstrukturen und Elektronendichtekarten räumlich dargestellt. Das Programm BRAGI (Schomburg and Reichelt, 1988) auf SGI-Workstations und Linux-PCs diente in diesem Zusammenhang zur Visualisierung, Vergleich und Analyse von Proteinstrukturen.

O ist ein speziell für die Proteinkristallographie geschriebenes Programm (SGI-Workstations, Linux-PCs). Es wird bei der Verfeinerung eingesetzt, um manuelle Anpassungen der Struktur an die Elektronendichtekarten vorzunehmen.

3.9 Strukturverfeinerung

Alle verwendeten Verfeinerungsprogramme wurden mit den folgenden Optionen verwendet:

- Glättung des diffusen Solvensanteils,
- automatischer Einbau von lokalisierten Wassermolekülen mit $B_{max} \leq 50^2$, einem $|F_{obs}| - |F_{calc}| \geq 4$ und einem Abstand von 2.5–4.0 Å,
- Berechnung von $3F_o2F_c$ - bzw. $2F_oF_c$ - und F_oF_c -Dichtekarten.

3.9.1 Verfeinerung mit X-PLOR und CNS

Sämtliche Anfangsverfeinerungen in dieser Arbeit wurden mit X-PLOR oder CNS vorgenommen. Verfeinerung mit X-PLOR und CNS bedeutet die Minimierung einer empirischen Energiefunktion nach der Methode der konjugierten Gradienten mit zwischengeschalteten MD-Simulationen. Dabei macht man sich den großen Konvergenzradius der MD zu Nutze.

Für die Verfeinerung der hochaufgelösten Struktur der R-ADH-Lb fand neben REFMAC und SHELX-97 auch CNS Anwendung. Dabei wurde die Energieminimierung nach einem MLKF-Algorithmus durchgeführt. Im Gegensatz zur Verfeinerung mit CCP4 und SHELX-97 bietet CNS keine Möglichkeit zur anisotropen Verfeinerung der Temperaturfaktoren und der Generierung von lokalisierten Wasserstoffatomen.

Die für die Verfeinerung verwendeten Eingabeskripte wurden bereits in Abschnitt 3.1.3 aufgelistet.

3.9.2 Verfeinerung mit CCP4

Die Verfeinerung der R-ADH-Lb mit CCP4 erfolgte skriptgesteuert, d.h. alle verwendeten Befehle und Unterroutrinen wurden in eine ausführbare Datei integriert. Die Verfeinerungsrechnung umfasste die Programme:

Vier bis zehn Zyklen:

HGEN	Generierung von Wasserstoffatomen (bei Hochauflösung)
SFALL	neue Röntgendatendatei inkl. Wasserstoffatome (bei Hochauflösung) erstellen
PROTIN	stereochemische Beschränkungen (<i>Restraints</i>) für REFMAC zusammenstellen
REFMAC	kristallographische Verfeinerung; Algorithmus: MLKF, WEIGHt MATRix: 0.5-200, B-Faktorverfeinerung: isotrop oder anisotrop

Anschließend:

FFT	Elektronendichtekarten berechnen
MAPMASK	
PEAKMAX	automatische Wassersuche
WATPEAK	

Typische CCP4-Standardskripte sind in A.1.1 angegeben.

3.9.3 Verfeinerung mit SHELX-97

SHELXL-97 benötigt zwei Eingabedateien, eine Datei mit den Reflexdaten und eine Datei mit allen Verfeinerungsoptionen sowie den Koordinaten. Nach jedem Verfeinerungszyklus wurde die Ausgabedatei mit den Koordinaten mit dem Programm SHELXPRO (Option U) für den nächsten Verfeinerungszyklus vorbereitet und eine neue Eingabedatei erstellt. Dabei wurden gegebenenfalls Residuen mit multiplen Konformationen definiert und lokalisierte Wasseratome (siehe Seite 63) aktualisiert, d.h. Reste mit zu hohen Temperaturfaktoren ($B > 50^2$) oder zu niedrigem Sigmalevel ($|F_{obs}| - |F_{calc}| < 4$) gelöscht.

Der Gewichtungsfaktor wurde fixiert auf WGHT 0.1 für alle Verfeinerungszyklen.

Eine typische Eingabedatei ist in A.1.2 angegeben.

3.9.4 Qualität der Modelle

Die stereochemische Qualität der verfeinerten Modelle wurde auf die Übereinstimmung mit den Standardwerten von ?) getestet und die Torsionswinkel wurden mit PROCHECK überprüft. Das Programm SHELXPRO (Sheldrick and Schneider, 1997) wurde für die Darstellung des mittleren Koordinatenfehlers durch ein Luzzati-Diagramm (Luzzati, 1952) und REFMAC sowie SFCHECK wurden zur Ermittlung der Übereinstimmung zwischen den verfeinerten Modellen und den Röntgendaten verwendet. Ein kombinierter Energie *Z-score* (*zpcomb*) wurde für die C_β Paarinteraktionen und die C_β Oberflächenterme mit PROSAIL (Sippl, 1993) berechnet.

3.10 Proteinmodellierung

Die räumliche Struktur der D-AO-Tv wurde mit der Methode der vergleichenden Modellierung (*homology modelling*) vorhergesagt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Proteinen mit einer Sequenzidentität von über 25 % eine ähnliche Struktur aufweisen, d.h. der gleichen Faltungsfamilie (SCOP-Nomenklatur, Murzin et al. (1995)) angehören. In der vorliegenden Arbeit wurde eine halbautomatische Methode verwendet. Dabei gibt man ein strukturelles Sequenzalignment vor. Insertionen und Deletionen werden automatisch modelliert und verfeinert. Die folgenden Programme wurden in der angegebenen Reihenfolge verwendet:

CLUSTALW	multiple Sequenzalignment (Thompson et al., 1994)
BOXSHADE	Darstellung multipler Sequenzalignments (siehe A.2)
JOY	Visualisierung von Strukturinformationen in Sequenzalignments zur Erstellung struktureller Sequenzalignments (siehe A.2, Mizuguchi et al. (1998))
MODELLER	Programm zur vergleichenden Modellierung vollständiger dreidimensionaler Proteinstrukturen (Sali and Blundell, 1993)
AMBER	Programmpaket für Kraftfeldrechnungen mit Biomolekülen (Pearlman et al., 1995)

Verwendete Unterrouinen von AMBER:

PROTONATE	Ergänzen von Wasserstoffatomen in Koordinatendateien
-----------	--

LINK94	Erstellen der Topologieinformationen für das Modell
EDIT94	Einpassen der Koordinaten des Modells in die Gesamttopologie
PARM94	Zuweisung der Kraftfeldparameter der Energiefunktion zu den erzeugten Topologien und Berechnung der Wasserhülle
SANDER	Modul zur Energieminimierung, Moleküldynamik und NMR-Verfeinerung

Energieminimierungen wurden unter Verwendung der im Beispielskript angegebenen Parameter durchgeführt (siehe A.1.3).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die R-ADH-Lb

4.1.1 Ausgangsbedingungen

Das Projekt der Strukturaufklärung der R-ADH-Lb wurde in Kooperation mit dem Institut für Enzymtechnologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf an der Kernforschungsanlage in Jülich durchgeführt. Die von den Kooperationspartnern (Frau Bettina Riebel, Arbeitsgruppe von Herrn Werner Hummel) geleisteten Vorarbeiten zur Strukturaufklärung werden im Folgenden kurz zusammengefasst:

- *Screening* nach einer ADH in *Lactobacillus brevis* mit einem anti-ADH-Antikörper (spezifisch für die ADH aus *Lactobacillus kefir*),
- Aufreinigung, biochemische Charakterisierung und Sequenzierung des Wildtyp-Enzyms,
- Klonierung der R-ADH-Lb,
- Expression der rekombinanten R-ADH-Lb in *E. coli* und Aufreinigung,
- Kristallisationsexperimente.

Die oben aufgeführten Experimente sind in der Dissertaion von Frau Riebel zusammengefasst (Riebel, 1996).

4.1.2 Aufreinigung

Vorgereinigte Enzymchargen wurden vom Kooperationspartner zur Verfügung gestellt. Die Reinheit betrug nach SDS-PAGE (Silberfärbung) ca. 90 %. Das Protein wurde nach dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Reinigungsschritt mit einer

Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Der verwendete Anreicherungsschritt erbrachte eine für die Kristallisation ausreichende Reinheit des Enzyms. In Abbildung 4.1 sind die Fraktionen der R-ADH-Lb vor und nach der Anionenaustauscherchromatographie im SDS-PAGE dargestellt.

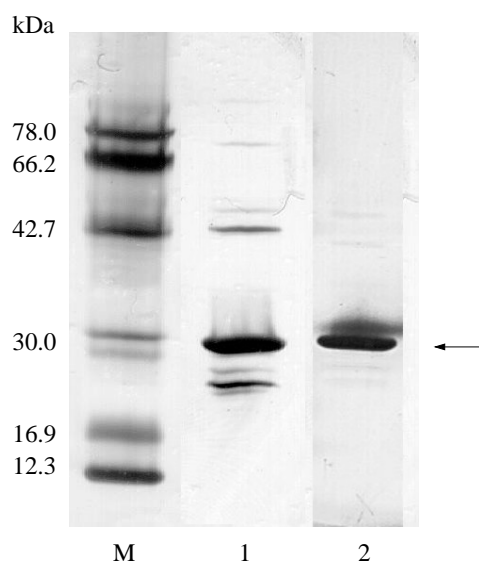


Abbildung 4.1: SDS-PAGE der R-ADH-Lb vor (1) und nach (2) der Anionenaustauscherchromatographie. Pfeil: R-ADH-Lb. M: Marker. Der Schatten oberhalb der R-ADH-Bande (2) ist auf einen Artefakt beim Erstellen der Abbildung zurückzuführen.

Das SDS-PAGE zeigt, dass nach dem Anreicherungsschritt die R-ADH-Lb bei apparenten 30 kDa eine Reinheit von ca. 95 % aufweist, was für eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins ausreichend war.

Anschließend wurden die sauberen Proteinproben vereinigt, aufkonzentriert und bei 4°C gelagert. Die Proteinproben liessen sich dabei problemlos auf eine Konzentration von bis zu 30 mg/ml anreichern. Die mittlere spezifische Aktivität der verschiedenen verwendeten Proteinchargen betrug (149.4 ± 17.3) U/mg. Die R-ADH-Lb erwies sich als ausgesprochen stabil, da nach mehreren Monaten Lagerung bei 4°C kein Aktivitätsverlust detektiert werden konnte.

4.1.3 Analytik

4.1.3.1 Massenspektren

Das Massenspektrum der R-ADH-Lb diente einerseits zur Reinheitskontrolle der Proben für die Kristallisation (MALDI-MS, siehe Abbildung 4.2) und andererseits zur genauen Bestimmung des Molekulargewichts des Proteins (ESI-MS, siehe Abbildung 4.3). Dies war notwendig, weil aus den ersten Elektronendichten des Strukturmodells nicht eindeutig hervorging, ob die R-ADH-Lb die N-terminale Aminosäure Met enthielt oder nicht.

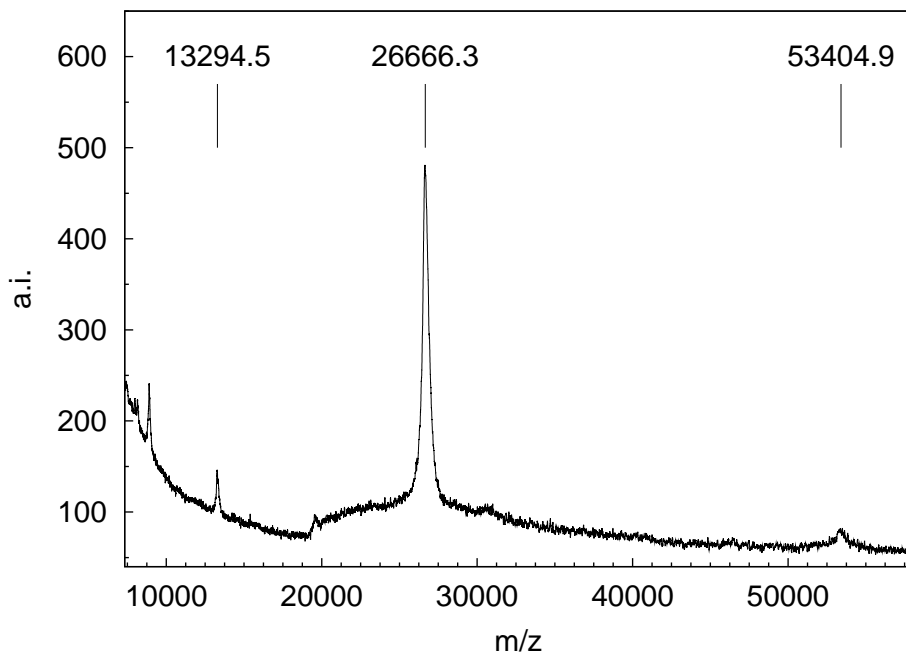


Abbildung 4.2: MALDI-MS der R-ADH-Lb. *Cut off*: 5000 Da. Spektrenakkumulation: 60. Externe Kalibrierung gegen BSA. Der Peak bei 53.4 kDa ist auf das einfach geladene Dimer der R-ADH-Lb zurückzuführen, der Peak bei 13.3 kDa entspricht dem zweifach geladenen Monomer und der Peak bei ca. 9 kDa stammt vom dreifach geladenen Mutterion.

Im MALDI-MS der R-ADH-Lb ist deutlich zu erkennen, dass die Probe sehr rein war. Lediglich bei ca. 20 kDa ist noch ein Peak von einer Verunreinigung zu er-

kennen, die im schon sehr sensitiven silbergefärbten SDS-PAGE (siehe Abbildung 4.1) nicht mehr zu erkennen ist.

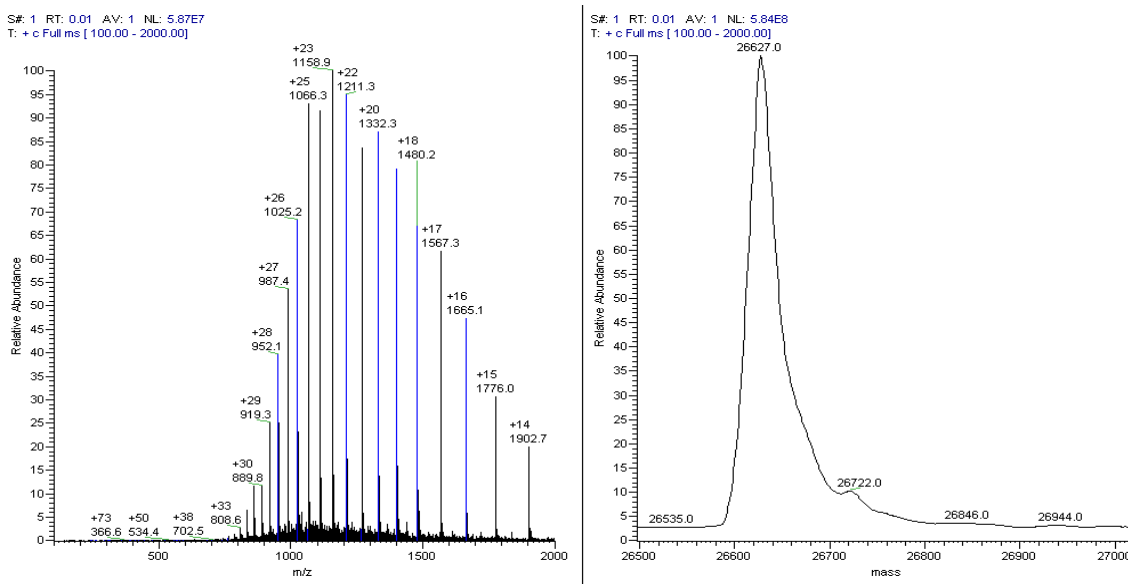


Abbildung 4.3: ESI-MS der R-ADH-Lb. Links: Originalspektrum. Rechts: Dekonvolviertes Spektrum. Die Schultern am Hauptpeak im dekonvolvierten Spektrum stammen von Addukten des Mutterions mit einwertigen Metallionen (Na^+ , K^+). S#: Nummern der einbezogenen Spektren. RT: Retentionszeit [min]. AV: Anzahl der gemittelten Spektren. NL: Ionenintensität. T: Massenbereich im Originalspektrum.

Der Peak bei 26627.0 Da im dekonvolvierten ESI-MS-Spektrum entspricht dem rechnerischen Molekulargewicht des R-ADH-Lb-Apoenzym (26627.2 Da) ohne das N-terminale Met. Somit konnte hier nachgewiesen werden, dass die N-terminale Aminosäure nach der Expression abgespalten wird, was bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen häufig der Fall ist. Dabei reduziert sich das Ausmaß der Abspaltung des Methionins durch die Methyaminopeptidase mit wachsender Länge der Seitenkette der zweiten Aminosäure (Hirel et al., 1989). Da die R-ADH-Lb an Position zwei ein Ser hat, ist die Abspaltung sehr wahrscheinlich. Das Fehlen dieses Methionins konnte später in der Strukturverfeinerung bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.1.10).

4.1.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Dynamische Lichtstreuexperimente dienen zur Bestimmung des Aggregationsgrades von Proteinproben. Derartige Untersuchungen können von entscheidendem Nutzen bei der Kristallisation von Proteinen sein, da in den meisten Fällen eine homogene Probe mit definiertem Aggregationsgrad ausschlaggebend für eine erfolgreiche Kristallisation ist.

Die durchgeführten Experimente wurden mit einer möglichst hohen Proteinkonzentration durchgeführt (2 mg/ml), um die Bedingungen während der Kristallisation möglichst gut nachzubilden. Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Experimente.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuexperimente mit der R-ADH-Lb. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus insgesamt 30 *Scans*. Die Molekulargewichtsabschätzung erfolgte mit dem Modell der „Vol. Shape Hydration 24–110 kDa“. Modus der Auswertung: bimodal.

hydrodynamischer Radius	(4.0 ± 0.4) nm und (15.4 ± 7.0) nm
berechnete Molekulargewichte	(108 ± 29) kDa und (7900 ± 14454) kDa
prozentuale Anteile	(100 ± 1) % und (0 ± 1) %
<i>Baseline</i>	1.003 ± 0.002
<i>SOS-Error</i>	0.787 ± 0.766

Das berechnete Molekulargewicht von 108 kDa entspricht dem eines Tetramers, welches bei der R-ADH-Lb die native Einheit darstellt (Riebel, 1996). Das zweite Molekulargewicht von 7900 kDa stammt von einer Verunreinigung in der Lösung, die nur einen sehr kleinen Anteil an der Gesamtzahl der Moleküle in Lösung ausmacht, was auch den großen Meßfehler erklärt. Diese Verunreinigung hätte man mittels Filtration durch eine 0.02 μ m-Membran entfernen können. Auf Grund der erheblichen Proteinverluste bei diesem Arbeitsschritt wurde davon abgesehen, da die Ergebnisse der Experimente auch so verwertbar waren.

Die R-ADH-Lb weist also unter den auch für die Kristallisation verwendeten Bedingungen nicht zur Aggregation, was die erfolgreichen Kristallisationsexperimente dokumentieren (siehe Abschnitt 4.1.4). Zudem weist das Experiment auf

die „Stabilität“ des Tetramers hin, das sowohl bei niedriger als auch bei hoher Proteinkonzentration das Holoenzym bildet, und nicht abhängig von den Bedingungen in Lösung, Einheiten mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad bildet.

4.1.3.3 CD-Spektren

Das CD-Spektrum der R-ADH-Lb ist in Abbildung 4.4 zu sehen.

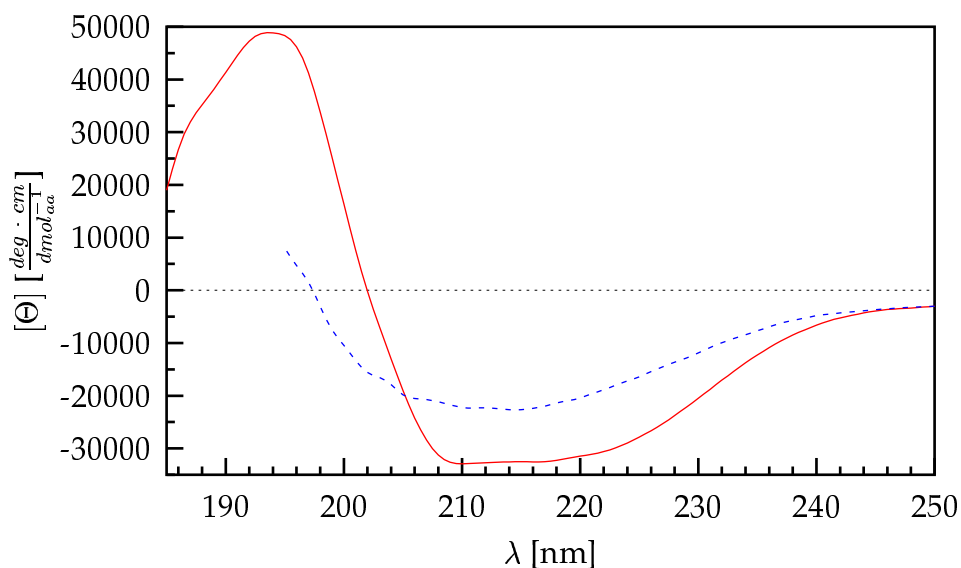


Abbildung 4.4: CD-Spektrum der R-ADH-Lb. Die rote durchgezogene Linie zeigt das Spektrum bei 20°C ohne vorheriges Aufheizen und die blaue gepunktete Linie das Spektrum bei 20°C nach vorhergehenden Aufheizen der Probe auf 90°C. Das Spektrum nach dem Aufheizen konnte nur bis 195 nm gemessen werden, da unterhalb dieser Wellenlänge das Signal-Rausch-Verhältnis sehr groß wurde.

Die beiden Spektren weisen deutliche Unterschiede sowohl in Intensität als auch im Kurvenverlauf auf. Dies bedeutet, dass die R-ADH-Lb nach Aufheizen auf 90°C und Abkühlen auf 20°C in einem anderen Faltungszustand vorliegt bzw. eine veränderte Sekundärstrukturverteilung aufweist. Es scheint keine Rückfaltung des Proteins stattgefunden zu haben, da die R-ADH-Lb nach dem Abkühlen

nicht mehr aktiv war. Die R-ADH-Lb benötigt zur Bildung der aktiven nativen Einheit (einem Homotetramer) zwei Mg^{2+} -Ionen pro Tetramer, die möglicherweise beim Abkühlen nicht mehr eingebaut werden (Riebel, 1996).

Da von der R-ADH-Lb die Sequenz bekannt ist, wurden – neben der Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus den CD-Spektren – auch Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt, die auf der Sequenz beruhen. Desweiteren wurden die aus der Struktur der R-ADH-Lb bestimmten Sekundärstrukturanteile zum Vergleich herangezogen. Die rechnerische Auswertung der Spektren mit den Programmen CONTIN und K2D ergab die in Tabelle 4.2 zusammengefaßten Sekundärstrukturanteile.

Tabelle 4.2: Mittels CD-Spektroskopie ermittelte Sekundärstrukturelemente der R-ADH-Lb. Alle Angaben in %. CONTIN (Referenzdatensatz): 16 native Proteine. SELCON (Referenzdatensatz): nach Johnson (1990). Die Vorhersage wurde mit dem Programm PREDATOR durchgeführt. Die Sekundärstrukturanteile der durch RSA ermittelten Struktur wurden mit dem Programm DSSP ermittelt.

	Contin	K2D	Vorhersage	RSA
α -Helix	54	60	26	43
β -Faltblatt	0	7	18	14
Rest	46	33	56	43

Im Rahmen der Genauigkeit der CD-Spektroskopie sind die Ergebnisse, die mit den verschiedenen Programmen berechnet wurden, in sich konsistent. Die Genauigkeit wurde allerdings durch die Verwendung mehrerer Programme nicht erhöht, weil die übliche Auswertung von CD-Spektren an sich schon fehlerbehaftet ist. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss dies mit berücksichtigt werden. Die R-ADH-Lb hat einen hohen Anteil an α -Helices und einen relativ geringen Anteil an β -Faltblättern (siehe Tabelle 4.2). Die Sekundärstrukturanteile sind für die α -helikalen Anteile aus den CD-Spektren berechnet eher zu hoch und für die β -Faltblattanteile zu niedrig.

Die sequenzbasierten Verfahren geben eine ganz andere Verteilung der Sekundärstrukturen an. Die α -helikalen Anteile sind zu niedrig und die β -Faltblattanteile

stimmen jedoch recht gut mit den Resultaten aus der Röntgenstruktur überein. Dennoch ist das Verfahren der CD-Spektroskopie, trotz der ungenauen Methoden zur Proteinbestimmung, zumindest bei der Vorhersage der α -helikalen Sekundärstrukturanteile der sequenzbasierten Vorhersage ebenbürtig.

Aus dem Habitus der Spektren kann man die Proteine grob in Faltungsklassen einteilen (Greenfield, 1996). Dabei können α + β -Proteine und α / β -Proteine durch das relative Verhältnis der Intensitäten der Banden bei 222 und 208 nm unterschieden werden. In α + β -Proteinen ist die Signal bei 208 nm größer als bei 222 nm. Demnach müßte die R-ADH-Lb der Klasse der α + β -Proteine angehören, was die Lösung der 3D-Struktur nicht bestätigt hat, da die R-ADH-Lb ein typischer Vertreter der α / β -Proteine ist (siehe Abbildung 4.19).

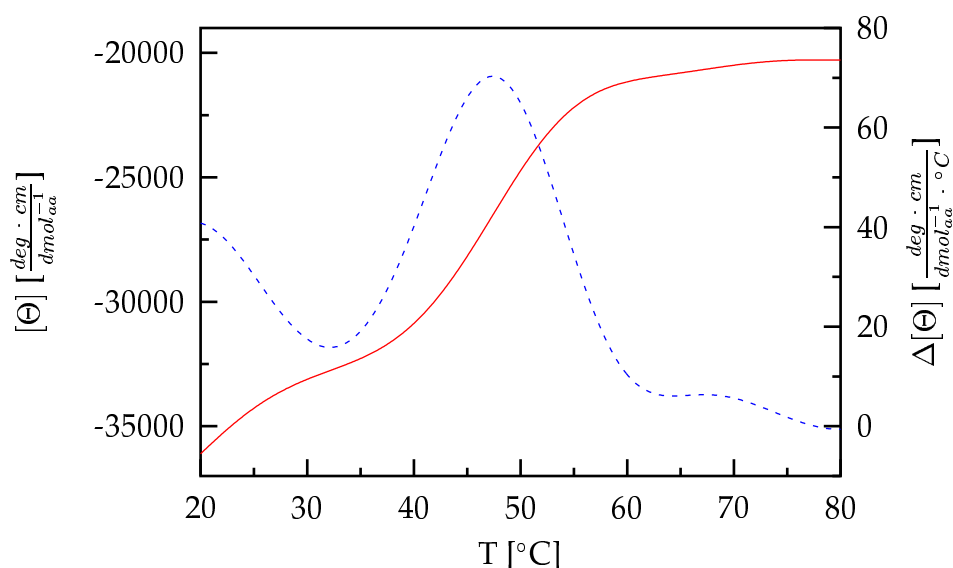


Abbildung 4.5: Schmelzkurve der R-ADH-Lb bei 210 nm. Die rote durchgezogene Kurve zeigt die Schmelzkurve der R-ADH-Lb und die blau gepunktete Kurve die erste Ableitung dieser Kurve nach der Temperatur.

Die Schmelzkurve der R-ADH-Lb (siehe Abbildung 4.5) wurde bei 210 nm gemessen, da das CD-Spektrum (siehe Abbildung 4.4) bei dieser Wellenlänge das größte Signal-Rausch-Verhältnis aufweist. Daher ist beim Aufheizen des Proteins bei dieser Wellenlänge auch die deutlichste Veränderung im Spektrum zu erwarten.

ten.

Der Schmelzpunkt ist als der Wendepunkt in der Schmelzkurve definiert. Dieser liegt bei ca. 47°C (Maximum der blauen gepunkteten Kurve in Abbildung 4.5). Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Daten aus den aktivitätsbasierten Untersuchungen zur Thermostabilität (maximal zwischen 25 und 40°C) und zum Temperaturoptimum der Aktivität (50°C) (Riebel, 1996). Möglicherweise liegt dieser Gegensatz in der Natur der Messmethode. Bei der Schmelzpunktbestimmung durch CD-Spektroskopie wird nicht direkt die Faltungsenthalpie eines Proteins gemessen, sondern die Verschiebung bzw. die Änderung der Interaktionen zwischen den Sekundärstrukturelementen in Abhängigkeit von der Temperatur. Folglich gibt der Schmelzpunkt die Temperatur des „Aufweichens“ der Tertiär- und Quartärstruktur wider und nicht die vollständige Entfaltung des Proteins. Möglicherweise zerfällt das Homotetramers in zwei aktive Homodimere. Außerdem ist der Schmelzpunkt als der Wendepunkt der Schmelzkurve definiert. Ein „Plateau“ – d.h. keine weiteren strukturellen Veränderungen – wird allerdings erst bei ca. 60°C erreicht.

4.1.4 Kristallisation

Eine Reihe von faktoriellen und systematischen Kristallisationsexperimenten wurden von der Kooperationspartnerin Frau Riebel in Jülich durchgeführt. Dabei konnten erste Kristalle des Apoenzyms der R-ADH-Lb unter Verwendung kleiner hydrophober Fällungsmittel wie MPD, PEG 400 oder PEGMME 550 gezüchtet werden.

Vorrangiges Ziel der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Kristallisationsexperimente war die Kristallisation der R-ADH-Lb mit dem Kosubstrat NADP und einem Substrat, um dezidierte Aussagen über den Reaktionsmechanismus machen zu können. Da kein substratanaloger Inhibitor für das Enzym bekannt ist, wurde das Substrat Acetophenon eingesetzt, das ebenso wie das Kosubstrat in der oxidierten Form vorlag. Damit sollte ein Abreagieren des Substrates verhindert und eine Bindung im aktiven Zentrum ermöglicht werden, sofern die Konzentration des Substrates hoch genug gewählt werden würde.

Da sich herausstellte, dass die schon vorhandenen Kristallisationsbedingungen

nicht für die nachträgliche Bindung von Kosubstrat und Substrat geeignet waren – da sich die Kristalle bei der Zugabe geringster Mengen NADP zersetzten –, musste nach neuen Wachstumsbedingungen für Kristalle in Anwesenheit von NADP und Acetophenon gesucht werden. Es wurden zunächst faktorielle Tests nach Jancarik and Kim (1991) (Crystal Screen, Fa. Hampton Research) und nach Cudney et al. (1994) (Crystal Screen 2, Fa. Hampton Research) sowie systematische Kristallisationsansätze mit einer großen Anzahl von Salzen und hydrophoben Reagenzien durchgeführt (McPherson, 1990). Die systematischen Ansätze dienten in erster Linie der Bestimmung der Sättigungskonzentration der R-ADH-Lb in verschiedenen Fällungsmitteln in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Fällungsmittelkonzentration.

Die Bedingungen, unter denen reproduzierbares Kristallwachstum beobachtet werden konnte, sind in Tabelle 4.3 zusammengefaßt. Daneben gab es noch eine Reihe von weiteren Bedingungen, unter denen Kristallwachstum beobachtet werden konnte, die aber nicht weiter verfolgt wurden.

Tabelle 4.3: Erfolgreiche Kristallisationsansätze der R-ADH-Lb. Die allgemeinen Kristallisationsbedingungen entsprechen den in Abschnitt 3.4.2 dargestellten. Die Kristallisationsergebnisse haben folgende bei der Dokumentation dieser Ergebnisse üblichen Kennzahlen: 4: Rosetten, Spherulite; 5: Nadeln; 7: Einkristalle < 0.2 mm; 8: Einkristalle > 0.2 mm; 9: Einkristalle mit Drusen.

	Fällungsmittel	Puffer	pH	Ergebnis
1	10–55 % MPD, 0–50 mM CaCl ₂	0.1 M HEPES/NaOH	7.0–7.5	4
2	20–48 % PEG 400, 1–50 mM MgCl ₂	0.1 M Tris/HCl	7.5–8.5	4, 5, 7, 8
3	19–22 % PEGMME 550, 50 mM MgCl ₂	0.1 M Tris/HCl	8.0–9.1	4, 5, 7, 8
4	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	verschiedene (0.1 M)	4.6–8.5	8
5	0.5–1.5 M Ammoniumphosphat	verschiedene (0.1 M)	4.5–8.5	7, 8, 9

Die Kristallisationsansätze wurden mit den Methoden des sitzenden und des hängenden Tropfens durchgeführt. Mit beiden Methoden wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt. Wegen der besseren Handhabbarkeit wurde bei der Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen die Methode des sitzenden Tropfens eingesetzt. Durch die Variation der Tropfengröße konnte die Kristallisation hingegen deutlich beeinflusst werden. Generell kann man sagen, dass in großen Tropfen (bis 5 μ l Endvolumen nach der Äquilibration) auch große Kristalle wuchsen.

Es zeigte sich wie auch schon bei der Kristallisation des Apoenzyms, dass sich kleine hydrophobe Fällungsmittel zur Verwendung anboten. Insbesondere die Kristallisation mit PEGMME 550 führte zu zuverlässiger Kristallisation und ergab die morphologisch besten Kristalle, die gegen mechanische Belastungen ausgesprochen stabil sowie länger als ein Jahr haltbar waren. Allerdings dauerte es ca. zwei bis drei Monate, bis erste Kristalle zu beobachten waren. Die optimale Kristallisationsbedingung enthielt 21 % PEGMME 550, 50 mM MgCl_2 , 0.1 M Tris/HCl pH 8.9 im Reservoir. Den Tropfen wurden zusätzlich 10–25 mM NADP und 30–50 mM Acetophenon zugefügt (Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach der Äquilibration). Die Abbildung 4.6 zeigt einen Kristall der R-ADH-Lb.

Auf Grund der langen Wachstumszeiten der Kristalle wurden, neben den normalen Kristallisationsansätzen, Impftechniken verwendet. Dabei wurden die Kristallisationsbedingungen so gewählt, dass die Fällungsmittelkonzentrationen keine Kristallkeimbildung mehr zuließen, vorhandene Kristalle sich jedoch nicht auflösten und weiterwachsen konnten (Fällungsmittelkonzentrationen um 5 bis 20 % verringert). Leider erbrachten die Ansätze nicht die gewünschte Beschleunigung bei der Kristallisation, es dauerte im Gegenteil eher länger (bis zu einem halben Jahr), bis Kristallkeime beobachtet werden konnten.

Für eine Vermessung von Kristallen der R-ADH-Lb mit Synchrotronstrahlung war es wünschenswert, für die Kristalle Cryobedingungen zu finden, da Proteinkristalle bei Raumtemperatur durch die hohe Intensität der Synchrotronstrahlung starke Strahlenschäden bekommen und ihr Streuvermögen schnell nachläßt. Die optimale Kristallisationsbedingung enthielt bereits ein Fällungsmittel (PEGMME 550), welches als Frostschutzmittel zur Verhinderung von Eisbildung



Abbildung 4.6: Orthorhombischer Kristall der R-ADH-Lb in der Raumgruppe I222, gewachsen in 21 % PEGMME 550, 50 mM MgCl_2 , 0.1 M Tris/HCl pH 8.9, 25 mM NADP und 50 mM Acetophenon. Größe: ca. $0.2 \times 0.2 \times 1.0$ mm.

geeignet war. Allerdings war die Konzentration nicht ausreichend, da die Kristalle beim Einfrieren Risse bekamen und auf den Beugungsaufnahmen starke Eisringe zu sehen waren. Deshalb wurden die Mikrobrücken mit den Kristallen in neue Reservoirlösungen überführt, die eine erhöhte Konzentration an PEGMME 550 enthielten. Die Fällungsmittelkonzentration wurde stufenweise von 21 % auf 30 % und anschließend auf 40 % PEGMME 550 erhöht. Für die Äquilibration genügte jeweils ein Tag.

4.1.5 Röntgendiffraktometrie

Ein erster Datensatz konnte mit einem Kristall des Apoenzyms gemessen werden, der von der Kooperationspartnerin Frau Riebel gezüchtet worden war (Niefind et al., 2000). Im weiteren Verlauf der Arbeit konnten mit den Kristallen des Holoenzym qualitativ hochwertige Daten gesammelt werden, die im Folgenden diskutiert werden.

Sämtliche röntgendiffraktometrisch untersuchten Kristalle der R-ADH-Lb erwiesen sich im Röntgenstrahl als ausgesprochen stabil. Somit konnten mit jeweils einem Kristall vollständige Datensätze gemessen werden. Die ersten Datensätze,

sowohl mit dem Apo- als auch mit dem Holoenzym, wurden mit einer Drehanode der Fa. Nonius und einer MacScience Bildspeicherplatte mit der hauseigenen Röntgenanlage gemessen. Ein Bild einer Beugungsaufnahme ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

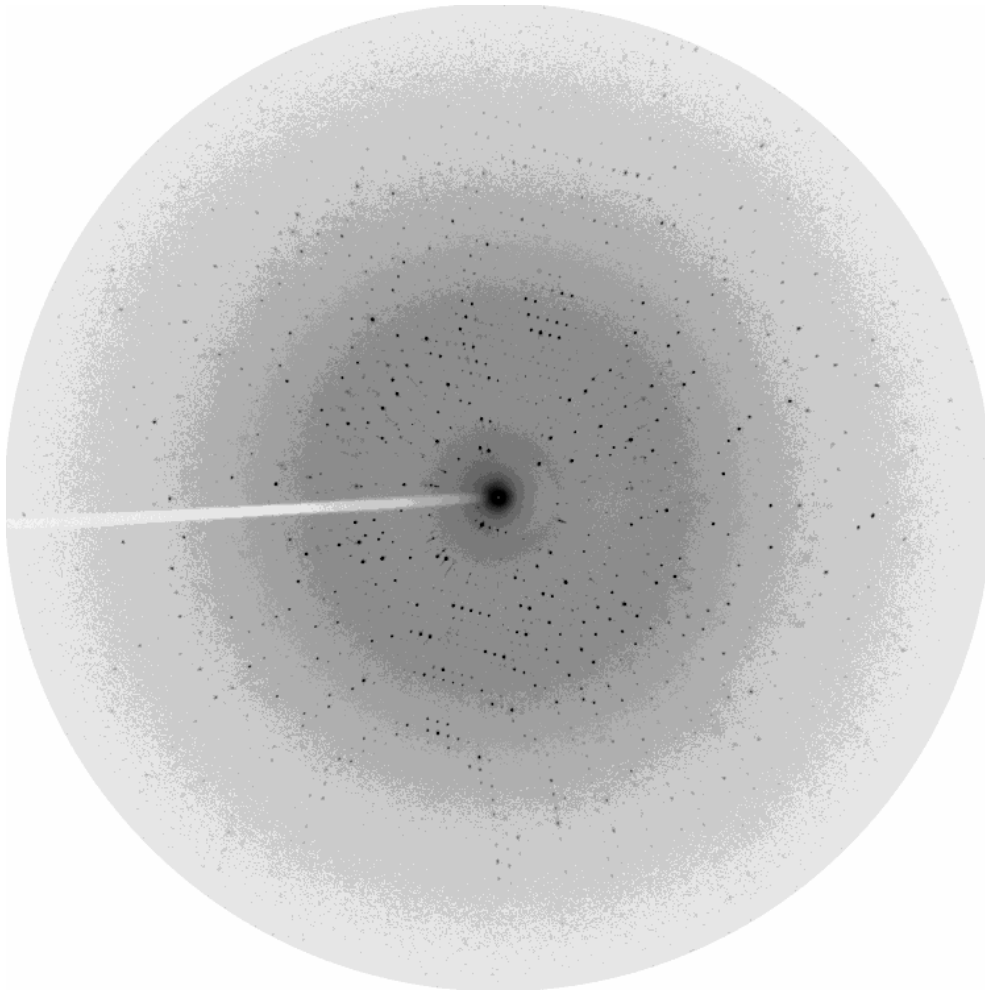


Abbildung 4.7: Beugungsaufnahme der I zentriert orthorhombischen Kristalle der R-ADH-Lb. Die Daten wurden mit Cu $K\alpha$ -Strahlung unter Verwendung einer Nonius Drehanode, eines MAC-XOS Doppelspiegelmonochromators und einer Mac Science Bildspeicherplatte aufgenommen. Messbedingungen: Temperatur: 4°C, Kristall-Detektor-Abstand: 120 mm, Drehung pro Aufnahme: 1°, Belichtungszeit pro Aufnahme: 20 min.

Die Daten ließen sich I zentriert orthorhombisch mit DENZO indizieren und integrieren. Die Skalierung und das vereinigen der Beugungsaufnahmen erfolgte mit dem Programm SCALEPACK. Dabei wurden folgende Gitterparameter ermittelt:

Kristallsystem I zentriert orthorhombisch (I222)
Gitterkonstanten $a = 56.49 \text{ \AA}$, $b = 84.42 \text{ \AA}$, $c = 115.26 \text{ \AA}$
 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Die Statistik des skalierten Datensatzes (R-ADH-Lb-*Home*) ist in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Die Auswertung des Datensatzes erwies sich als problemlos, da die Mosaizität unter 0.2° lag und es keinerlei Überlappungen bei den Reflexen gab. Mit einem I/σ_I von 5.1 und einem R_{sym} von 28.0 % im hochaufgelösten Bereich kann der Datensatz bis 1.79 \AA als vollständig angesehen werden. Im Reflexmuster lagen keine systematischen Auslöschungen oder Reflexabschwächungen vor. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass keine Schraubenachsen oder Pseudozentrierungen vorlagen.

Der oben beschriebene Datensatz diente zur Lösung der Struktur der R-ADH-Lb durch molekularen Ersatz (siehe Abschnitt 4.1.8).

Zur Verbesserung der maximalen Auflösung der Struktur und der besseren Lokalisation von Kosubstrat und Substrat in der 3D-Struktur der R-ADH-Lb sollte mit Synchrotronstrahlung ein weiterer Tieftemperaturdatensatz gesammelt werden.

Für die Messung eines kompletten Datensatzes genügte ein Kristall (siehe Abbildung 4.6), der unter Stickstoffkühlung vermessen wurde. Wegen des hohen Streuvermögens des Kristalls war die Messung von zwei Datensätze geboten. Für den hochaufgelösten Datensatz musste eine lange Belichtungszeit verwendet werden, um im hochaufgelösten Bereich der Beugungsaufnahmen verwertbare Intensitäten zu erhalten. Dies hatte zur Folge, dass die meisten Reflexe im niedrigaufgelösten Bereich überladen waren und nicht mehr ausgewertet werden konnten (siehe Abbildung 4.8). Deshalb wurde ein zweiter Datensatz mit kürzeren Belichtungszeiten und geringerem Auflösungsbereich gesammelt (siehe Abbildung 4.9), um den Datensatz im Bereich niedriger Auflösung zu vervollständigen.

Tabelle 4.4: Charakteristische Daten der R-ADH-Lb-Datensätze. R-ADH-Home: Datensatz, der an der internen Röntgenanlage gemessen wurde. R-ADH-DESY: Gemessen an der *Beamline* BW7B (Multipol-Wiggler), DORIS-Speicherring, EMBL c/o DESY Hamburg.

	R-ADH-Home	R-ADH-DESY
Wellenlänge [Å]	1.5418	0.8439
Temperatur der Datensammlung [K]	285	100
Anzahl Observationen	157 288	639 510
Anzahl Observationen ($I/\sigma_I > 1$)	156 670	635 730
Anzahl unabhängiger Reflexe	25 195	141 844
Auflösungsbereich [Å]	100–1.79	20–0.99
Multiplizität	6.2	4.5
Multiplizität (erste Schale [Å])	6.3 (100–3.87)	3.6 (20–3.04)
Multiplizität (letzte Schale [Å])	6.1 (1.86–1.79)	3.4 (1.00–0.99)
Durchschnitt I/σ_I	24.6	25.0
Durchschnitt I/σ_I (erste Schale)	33.8	37.1
Durchschnitt I/σ_I (letzte Schale)	5.1	2.2
Vollständigkeit [%]	98.3	99.7
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	94.1	97.2
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	95.6	99.9
R_{sym} [%]	6.2	5.7
R_{sym} (erste Schale) [%]	4.2	3.1
R_{sym} (letzte Schale) [%]	28.0	65.3

Die Datensätze wurden einzeln mit dem Programm DENZO indiziert und integriert. Beim hochaufgelösten Datensatz wurden die Daten von 2.5 Å bis zu einer maximalen Auflösung von 0.99 Å und beim niedrigaufgelösten Datensatz von 20 Å bis maximal 1.4 Å in die Integration einbezogen. Während der Skalierung mit SCALEPACK wurden die beiden Datensätze vereinigt, wobei die überladenen Reflexe des hochaufgelösten Datensatzes ignoriert wurden (Statistik: siehe Tabelle 4.4).

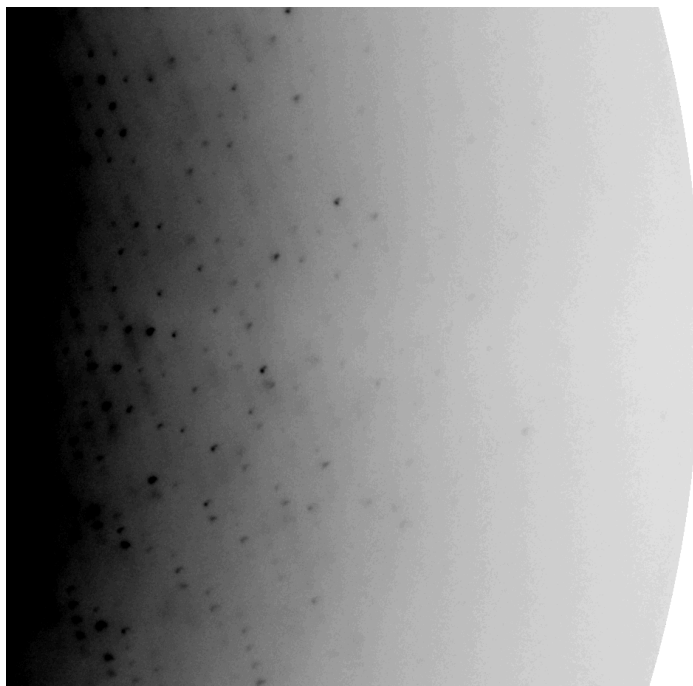


Abbildung 4.8: Hochaufgelöste Beugungsaufnahme der I zentriert orthorhombischen Kristalle der R-ADH-Lb. Gezeigt ist der Ausschnitt von ca. 1.4 \AA (links) bis 0.93 \AA . Die Daten wurden mit Synchrotronstrahlung ($\lambda = 0.8439 \text{ \AA}$) an der Multipol-Wiggler-*Beamline* BW7B (DORIS-Speicherring) an der EMBL-Außenstelle c/o DESY in Hamburg gemessen. Die Detektion erfolgte mit einer MAR345 Bildspeicherplatte. Messbedingungen: Temperatur: 100 K, Kristall-Detektor-Abstand: 125 mm, Drehung pro Aufnahme: 0.4° , Röntgendosis pro Aufnahme: 4 500 Units. Kollimatordurchmesser: 0.3 mm.

Es ergaben sich folgende Gitterparameter:

Kristallsystem	I zentriert orthorhombisch (I222)
Gitterkonstanten	$a = 55.99 \text{ \AA}$, $b = 80.11 \text{ \AA}$, $c = 114.59 \text{ \AA}$
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Die Mosaizität lag mit ca. 0.6° deutlich über der des Raumtemperaturdatensatzes, jedoch konnte der Datenverlust durch Reflexüberlappung mit dem kleinen Drehwinkel von 0.4° pro Aufnahme vermieden werden. Die Datenqualität bei hoher

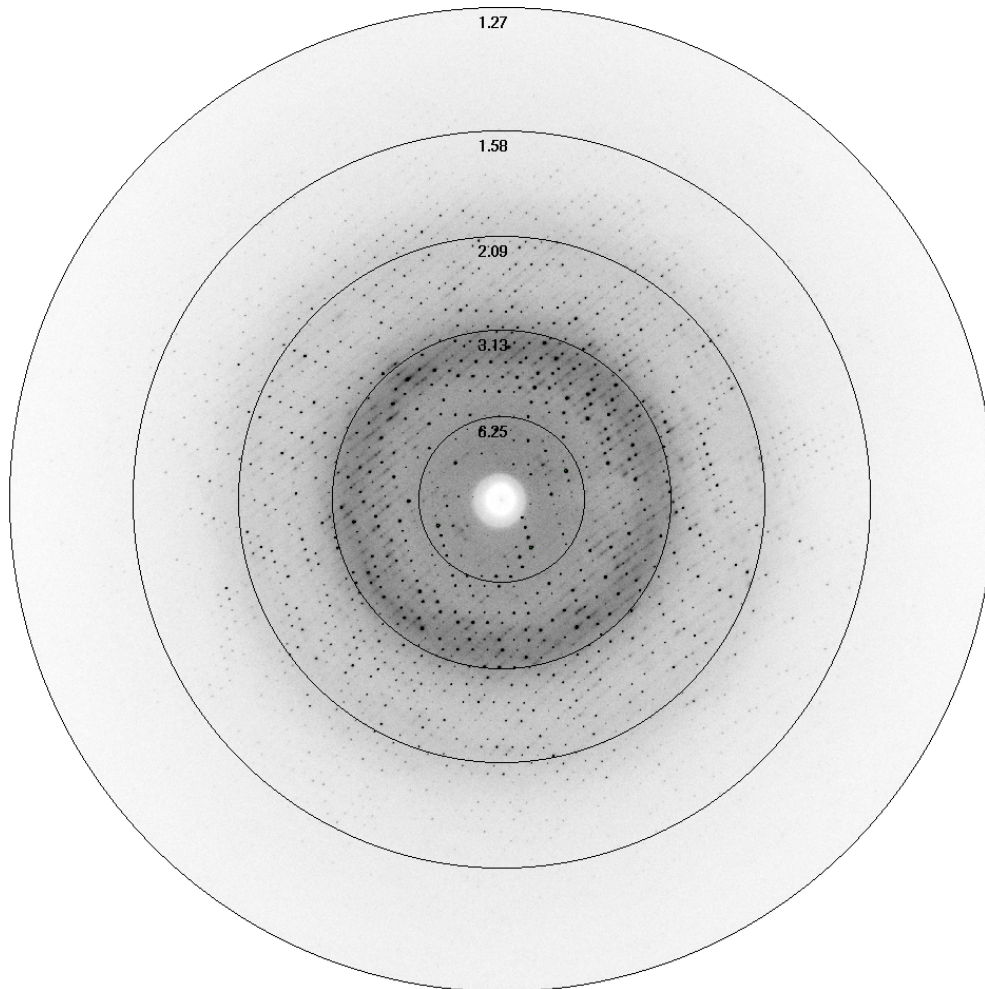


Abbildung 4.9: Niedrigaufgelöste Beugungsaufnahme der I zentriert orthorhombischen Kristalle der R-ADH-Lb. Die Daten wurden mit Synchrotronstrahlung ($\lambda = 0.8439 \text{ \AA}$) an der Multipol-Wiggler-*Beamline* BW7B (DORIS-Speicherring) an der EMBL-Außenstelle c/o DESY in Hamburg gemessen. Die Detektion erfolgte mit einer MAR345 Bildspeicherplatte. Messbedingungen: Temperatur: 100 K, Kristall-Detektor-Abstand: 215 mm, Drehung pro Aufnahme: 1° , Röntgendosis pro Aufnahme: 52 Units, maximale Auflösung: 1.27 \AA . Kollimatordurchmesser: 0.3 mm.

Auflösung ist nicht mehr sehr gut, was auf das niedrige Signal-Rausch-Verhältnis sowie die damit verbundenen Inhomogenitäten der einzelnen Observationen der

Reflexe zurückzuführen ist. Dies spiegelt sich in den hohen R_{sym} -Werten wider. Als Ausschlußkriterium für die Verwendung der hochaufgelösten Daten in der Strukturverfeinerung wurde ein I/σ_I von 2 festgelegt. Somit kann der Datensatz im Auflösungsbereich von 20–0.99 Å als vollständig angesehen werden.

Die Kristallform entspricht der, die bei dem Datensatz gefunden wurde, mit dem die Struktur gelöst wurde (R-ADH-Home). Folglich sollten sich bei der Übertragung der Strukturdaten auf den hochaufgelösten Datensatz keine Probleme ergeben.

4.1.6 Test auf merohedrische Verzwilligung

Die Bestimmung des Verzwilligungsgrades der röntgendiffraktometrisch untersuchten Kristalle erfolgte mit dem Service des UCLA-DOE-Servers (siehe A.2, Yeates (1997)). Bei keinem der beiden oben beschriebenen Datensätze konnte weder eine partielle oder perfekte Verzwilligung ermittelt werden.

4.1.7 Untersuchungen der Kristallpackung

Bei der Berechnung der Packungsdichte mit dem Programm MATTHEWS_COEF (CCP4, 1994) für den ersten in Abschnitt 4.1.5 beschriebenen Datensatz (R-ADH-Home) wurden die dort angegebenen Zellparameter, die Raumgruppe I222, ein Molekulargewicht von 26.63 kDa und eine Proteindichte von 1.22 mg/ml verwendet (Andersson and Hovmöller, 2000). Bei einem Monomer in der asymmetrischen Einheit konnte eine sinnvolle Lösung ($V_M = 2.58 \frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}$, Lösemittelanteil: 47.3 %) gefunden werden (Matthews (1968), siehe Abschnitt 2.2.2.4). Üblicherweise findet man für diese Raumgruppe Lösemittelanteile von 36.5–59 % (Andersson and Hovmöller, 2000).

Die Ermittlung der nichtkristallographischen Symmetrie erübrigte sich somit für diese Kristallform.

Für den hochaufgelösten Synchrotondatensatz (R-ADH-Lb-DESY) wurde diese Berechnung ebenfalls durchgeführt, da die Gitterkonstanten auf Grund der Meßtemperatur von 100 K etwas kleiner als beim Raumtemperaturdatensatz (R-ADH-Lb-Home) sind. Es ergaben sich geringe Abweichungen beim Matthews-

Koeffizienten ($V_M = 2.41 \frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}$) und dem Lösemittelgehalt des Kristalls (44.3 %).

4.1.8 Rechnungen zum Molekularen Ersatz

4.1.8.1 Suche der Modellsequenz

Durch Sequenzanalyse und Alignments ist bekannt, dass die R-ADH-Lb einer Gruppe von Proteinen angehört, die in der Literatur als *short chain alcohol dehydrogenases* bezeichnet werden (Persson et al. (1991), Jörnvall et al. (1995)). Da zu Beginn der Arbeit bereits von drei Enzymen dieser Gruppe die 3D-Strukturen aufgeklärt waren und die Sequenzidentitäten größer als 30 % sind (Ghosh et al. (1991), Tanaka et al. (1996a), Tanaka et al. (1996b)), lag es nahe, die Strukturlösung mit Hilfe des molekularen Ersatzes zu versuchen. Hierzu wurde in der PDB eine Recherche mit FASTA durchgeführt (Pearson and Lipman, 1988).

Das Protein mit der höchsten Sequenzidentität zur R-ADH-Lb ist die 3- α ,20- β -Hydroxysteroiddehydrogenase (Ghosh et al. (1991), PDB-Kürzel: 2HSD). Abbildung 4.10 zeigt das Sequenzalignment der R-ADH-Lb mit der 2HSD.

Die Sequenzidentität mit der 2HSD beträgt nach dem Sequenzalignment 38.7 %. Zudem sind die Identitäten über das gesamte Molekül verteilt, was auf einen identischen Faltungstyp schließen lässt. Das Modell konnte erfolgreich für die Strukturlösung mittels molekularen Ersatz verwendet werden.

4.1.8.2 Kreuzrotationsrechnungen

Zur Bestimmung der Kreuzrotationslösung wurde X-PLOR (Brünger, 1992b) eingesetzt. Als Suchmodell diente ein Monomer der 2HSD, das auf einen Poly-Ala Strang reduziert wurde (Glycine wurden nicht ausgetauscht). Die Suche wurde mit einem Pattersonradius von 25 Å und einer Schrittweite von 5° im Auflösungsbereich von 15–5 Å durchgeführt. Die Suche lieferte eine Lösung mit einem hohen Wert für die Rotationsfunktion (1.82) und lag damit ca. 25 % über der zweithöchsten Lösung. Nach der Patterson-Korrelationsverfeinerung der Rotationslösungen ergaben sich für die beste Rotationslösung folgende Eulerwinkel: $\theta_1 = 152.52^\circ$, $\theta_2 = 59.49^\circ$, $\theta_3 = 54.20^\circ$.

```

>>2HSD:A 3 Alpha, 20 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (H (253 aa)
  initn: 448 initl: 136 opt: 548 Z-score: 679.2 expect() 1.1e-31
  Smith-Waterman score: 548; 38.710% identity in 248 aa overlap

>2HSD:A      2- 249:-----:
                                10      20      30      40      50      60
R-ADH-Lb  SNRLDGKVAIITGGTLGIGLAIATKFVEEGAKVMITGRHSDVGEKAAKSVGTPDQIQFFQ
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
2HSD:A    NDLSGKTVIITGGARGLGAEAAQAVAAGARVVLADVLDEEGAATARELG--DAARYQH
          10      20      30      40      50

                                70      80      90      100     110     120
R-ADH-Lb  HDSSDEDGWTKLFDATEKAFGPVSTLVNNAGIAVNKSVEETTTAEWRKLLAVNLDGVFFG
          : . . . : . . . : : : : : : : : : : : . . . . . : : : :
2HSD:A    LDVTIEEDWQRVVAYAREEFGSVDGLVNNAGISTGMFLETESVERFRKVVEINLTGVFIG
          60      70      80      90      100     110

                                130     140     150     160     170     180
R-ADH-Lb  TRLGIQRMKNKGLGASIIINSSIEGFVGDPSTLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKDYDV
          . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : .
2HSD:A    MKTVIPAMKDAG-GGSIVNISSAAGLMGLALTSSYGASKWGVRLSKLAAVE--LGTDR
          120     130     140     150     160     170

                                190     200     210     220     230     240
R-ADH-Lb  RVNTVHPGYIKTPLVDDLPGAEAEAMSQRKTTPMGHIGEPNDIAYICVYLASNESKFATGS
          : : : : : : : : . . : . . . . : : : : : : : : : : : : :
2HSD:A    RVNSVHPGMTYTPMTAET-GIRQGEKNYPNTPMGRVGEPGEIAGAVVKLLSDTSSYVTGA
          180     190     200     210     220     230

                                250
R-ADH-Lb  EFVVDGGGYTAQ
          : : : : : :
2HSD:A    ELAVDGGWTTGPTVKYVMGQ
          240     250

```

Abbildung 4.10: Sequenzalignment von R-ADH-Lb und 2HSD mit FASTA (PDB) nach dem Smith-Waterman Algorithmus (Smith and Waterman, 1981). Doppelpunkte: identische Aminosäuren. Punkte: ähnliche Aminosäuren.

4.1.8.3 Translationsrechnungen

Mit der höchsten Lösung der Rotationssuche (s.o.) wurde nach der korrekten Positionierung des Suchmoleküls in der Einheitszelle gesucht. Die Rechnung erfolgte in Schritten von $(0.5 \times \text{Gitterkonstante})^{-1} \text{ \AA}$ im Auflösungsbereich von 15–5 Å. Für die beste Lösung war der Schwerpunkt des Suchmodells bei $x = 3.89 \text{ \AA}$, $y = 15.13 \text{ \AA}$, $c = 13.47 \text{ \AA}$ mit einem Wert für die Translationsfunktion von

$\frac{T(t_x, t_y, t_z) - T_{Mittelwert}}{\sigma_T} = 4.98$ und einem Packungswert $P = 0.279$ auszumachen. Diese Lösung lag etwa 16 % über der zweithöchsten Lösung ($\frac{T(t_x, t_y, t_z) - T_{Mittelwert}}{\sigma_T} = 4.16$). Der R-Wert lag nach der anschließenden Starre-Körper-Verfeinerung bei 52.5 %.

4.1.9 Strukturverfeinerung

Zu Beginn der Strukturverfeinerung wurden aus dem Reflexdatensatz mit Hilfe eines Zufallsgenerators 5 % der Reflexe als Testdatensatz (freie Reflexe) zur Berechnung des freien R-Wertes (*cross validation*, Brünger (1997)) ausgewählt. Danach wurde das korrekt positionierte Suchmodell mit dem Programm X-PLOR unter Verwendung einer Moleküldynamik (*simulated annealing*), beginnend bei 3000 K, energieminiert.

Die Modellierung der Seitenketten - es wurde mit einem Poly-Ala-Modell begonnen (siehe Abschnitt 4.1.8.2) - und die Strukturverfeinerung erfolgte im wesentlichen in zwei alternierenden Schritten. Zunächst wurde die maximale Auflösung auf 2.1 Å begrenzt und die Poly-Ala-Seitenketten mit dem Programm O gegen die korrekten Reste ausgetauscht. Da nicht für alle Residuen zu Beginn eine interpretierbare Elektronendichte vorhanden war, musste der Austausch schrittweise erfolgen. Zwischen den Modellbausritten in O wurde die Struktur mit dem Programm X-PLOR mit einer Moleküldynamik beginnend bei einer Temperatur von 3000 K minimiert. Nachdem alle Ala-Seitenketten ausgetauscht worden waren, wurden lokalisierte Wassermoleküle in das Strukturmodell eingebaut und auch die hochaufgelösten Reflexe bis zu einer maximalen Auflösung von 1.79 Å in die Verfeinerung integriert.

Der N-Terminus und ein flexibler Loop (AS 187-202) erwiesen sich als die problematischsten Bereiche beim Modellbau. Es war nicht bekannt, ob das N-terminale Met in der Struktur vorhanden war oder nicht. Durch die Messung eines ESI-MS (siehe Abschnitt 4.1.3.1) und die spätere Verfeinerung des hochaufgelösten Datensatzes (s.u.) konnte das Fehlen dieser Aminosäure nachgewiesen werden. Die vollständige Modellierung des flexiblen Loops gelang erst, nachdem alle anderen Aminosäuren ausgetauscht und alle Lücken geschlossen bzw. Insertionen entfernt worden waren. Beim ersten kompletten Strukturmodell der R-ADH-Lb lagen nicht alle Seitenketten vollständig in der Elektronendichte. Erst die Lösung

der hochaufgelösten Struktur, die aus einem Tieftemperaturdatensatz berechnet wurde, ermöglichte die 3D-Darstellung der gesamten Peptidkette der R-ADH-Lb. Bei 100 K ist die termische Bewegung der Reste kleiner als bei Raumtemperatur und durch die höhere Auflösung ließen sich mehr multiple Konformationen verfeinern.

Der Einbau von definierten Wassermolekülen führte zu einer weiteren Verbesserung der R-Werte. Dabei erwies sich der C-Terminus, der an einer Kontaktstelle zwischen zwei Monomeren liegt, als weitere neuralgische Stelle in der Struktur. Auf der Symmetrieachse lag ein sechsfach koordiniertes „Wassermolekül“ mit niedrigem Temperaturfaktor ($B = 2 \text{ \AA}^2$). Dies war ein Hinweis für die spezifische Bindung eines Metallions in der Dimerisierungsdomäne des Proteins.

Für die R-ADH-Lb wurde eine Zn^{2+} -Ionenabhängigkeit postuliert und eine $\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionenabhängigkeit (siehe Seite 122) nachgewiesen (Riebel, 1996). Daher wurde den Kristallisationslösungen – wegen der ähnlichen chemischen Eigenschaften – sowohl Ca^{2+} - als auch Mg^{2+} -Ionen zugesetzt. Auf Grund der Koordinationszahl von sechs, den Atomabständen und den R-Werten konnte letztlich ein Mg^{2+} -Ion auf der Symmetrieachse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.24 und Abschnitt 4.1.10).

Die einzelnen Verfeinerungsschritte sind in Tabelle 4.5 zusammengefaßt.

Tabelle 4.5: Übersicht über die wichtigsten Stufen der Verfeinerung des R-ADH-Lb-Apoenzym-Strukturmodells. Alle mit X-PLOR ausgeführten Verfeinerungsschritte erfolgten mit Energieminimierung und *simulated annealing*. In der Verfeinerung mit REFMAC wurde der *maximum likelihood*-Algorithmus (MLKF) verwendet. NW: Anzahl vollständig okkupierter Wassermoleküle. $NW_{1/2}$: Anzahl halb okkupierter Wassermoleküle. NX: Anzahl anderer Atome (z.B. Mg^{2+}).

Modell- und Verfeinerungsparameter	Programm	NW/ $NW_{1/2}$ /NX	R_{work} [%]	R_{free} [%]
Starre-Körper-Verfeinerung (15–6 Å)	X-PLOR	0/0/0	52.5	–
Moleküldynamik (100–2.5 Å)	X-PLOR	0/0/0	39.8	47.7
Modellbau und Verfeinerung (100–2.1 Å)	X-PLOR	0/0/0	25.7	35.6
Modellbau und Wassersuche (100–2.1 Å)	X-PLOR	78/0/0	18.4	23.4
Modellbau und Wassersuche (100–1.8 Å)	X-PLOR	110/0/0	19.4	23.0
Modellbau, Solvensglättung und Wassersuche	X-PLOR	129/0/0	19.4	22.0
Modellbau und Loopverfeinerung	X-PLOR	129/0/0	17.6	19.4
	REFMAC	129/0/0	17.2	20.7
Modellbau und Wassersuche	REFMAC	229/0/0	16.3	17.2
Modellbau und Metallionen	REFMAC	225/4/1	15.5	19.3
Modellbau und Wassersuche	REFMAC	238/4/1	15.0	19.1

Das Strukturmodell enthielt zu diesem Zeitpunkt weder Kosubstrat noch Substrat. Eine genaue Lokalisierung dieser beiden Moleküle im aktiven Zentrum und eine eingehende Analyse des aktiven Zentrums sollte mittels des in Abschnitt 4.1.5 beschriebenen Datensatzes (R-ADH-*Home*) möglich sein, da der vermessene Kristall in Anwesenheit von NADP und Acetophenon gewachsen ist. Leider ließ sich im aktiven Zentrum nur der Adeninteil des NADP lokalisieren.

4.1.9.1 Verfeinerung der hochaufgelösten Struktur

Die verfeinerten Koordinaten des oben diskutierten Datensatzes dienten als initiales Modell für die Verfeinerung des hochaufgelösten Datensatzes (siehe Abschnitt 4.1.5). Zunächst wurden alle Wassermoleküle aus der Koordinatendatei entfernt. Den ersten Schritt der Strukturverfeinerung bildete eine Starre-Körper-Verfeinerung (Auflösungsgrenze 2.1 Å). Die resultierenden R-Werte betrugen 43.4 % für den R-Wert und 43.0 % für den freien R-Wert. Der zweite Verfeinerungsschritt erfolgte mit X-PLOR, unter Verwendung einer Moleküldynamik beginnend bei 4000 K mit einer maximalen Auflösung von 1.8 Å. Der R-Wert verringerte sich auf 28.2 %, der freie R-Wert auf 32.7 %.

Bei der Endverfeinerung der Struktur wurden die Temperaturfaktoren (oder *atomic displacement parameters* (ADP's)) anisotrop verfeinert, was für Strukturen mit einer Auflösung besser als 1.5 Å empfohlen wird (Kleywegt, 2000). Da sich durch die Generierung definierter Wasserstoffatome die Rechenzeit erheblich verlängerte, wurden diese erst in den letzten Verfeinerungszyklen eingebaut. Die R-Werte konnten durch diese Maßnahmen noch einmal deutlich reduziert werden.

Im Folgenden wurden parallel mehrere Verfeinerungsstrategien angewendet, die sich an der für das jeweils verwendete Programmpaket zugrunde liegenden „Philosophie“ orientierte. Die Vorgehensweise bei der Anwendung der einzelnen Programmpakete ist bereits in Abschnitt 3.9 näher erläutert worden.

Verfeinerung mit CCP4 CCP4 ist ein modular zusammengesetztes Programmpaket, das für die Verfeinerung auf mehrere Programme zugreift. Die verwendeten Einzelroutinen entsprechen den in Abschnitt 3.9.2 beschriebenen. Die chro-

nologische Abfolge der Verfeinerungsschritte ist in Tabelle 4.6 zusammengefaßt.

Tabelle 4.6: Übersicht über die wichtigsten Stufen der Strukturverfeinerung des hoch aufgelösten Datensatzes mit CCP4. WEIGht MATRIX: Gewichtungsfaktor zwischen den Röntgentermen und der stereochemischen Restriktionen. NW: Anzahl vollständig okkupierter Wassermoleküle. NW_{1/2}: Anzahl halb okkupierter Wassermoleküle. NX: Anzahl anderer Atome (Mg²⁺, NADP, Acetophenon). ACP: PDB-Kürzel für Acetophenon.

Schritt	Modell- und Verfeinerungsparameter	WEIG MATR	NW/NW _{1/2} /NX	R_{worb} [%]	R_{free} [%]
0	frühere Zyklen, 20–1.4 Å		348/3/49	18.28	21.40
1	anisotrope B-Faktoren	0.9	371/3/49	16.38	19.51
2	Anpassung in O, multiple Konformationen	0.9	396/3/49	16.11	19.22
3	Anpassung in O und ACP-Einbau	20.0	420/5/62	12.66	16.56
4	Auflösung 20–1.10 Å	100.0	430/5/62	13.92	16.69
5	kleinere Anpassungen in O	100.0	407/5/62	13.01	15.49
6	Auflösung 20–0.99 Å	10.0	407/5/62	15.30	17.12
7	Generierung von Wasserstoffatomen	200.0	409/5/62	13.61	15.73
8	NAP, ACP mit isotropen Temperaturfaktoren	200.0	407/5/62	13.34	15.57
9	kleinere Anpassungen, Wasser: B < 50 Å ²	200.0	386/5/62	13.35	15.26

Die Durchführung der Rechenzyklen erfolgte mit einer Glättung der diffusen Solvensanteile. In die anisotrope Verfeinerung der Temperaturfaktoren wurden die Proteinatome und Mg^{2+} -Ionen einbezogen. NADP und Acetophenon wurden isotrop verfeinert. Eine Verfeinerung der multiplen Konformationen ist in CCP4 nicht implementiert.

Der Gewichtungsfaktor zwischen Röntgendaten und stereochemischen Restriktionen wurde für jedem Verfeinerungszyklus neu bestimmt. Der hohe Wert in den letzten Schritten der Verfeinerung entspricht einer starken Gewichtung zu Gunsten der Röntgendaten und entspricht einer guten Übereinstimmung zwischen den gemessenen (F_{obs}) und den berechneten Strukturfaktoramplituden (F_{calc}).

Unter Schritt 0 sind die ersten Verfeinerungszyklen mit CCP4 zusammengefaßt. Es wurden erste Wassermoleküle gesucht und die Auflösungsgrenze auf 1.4 Å erhöht. In den folgenden Schritten wurden nach und nach immer mehr Reflexe aus dem hochaufgelösten Bereich in die Verfeinerung integriert. Desweiteren wurde der Gewichtungsfaktor erhöht, was einer stärkeren Gewichtung der Röntgenterme gegenüber den stereochemischen Restriktionen entspricht. Dadurch ist zwar das Verhältnis zwischen der Anzahl der Röntgenreflexe und der Anzahl zu verfeinernder Parameter verringert worden, jedoch durch die Hinzunahme der hochaufgelösten Reflexe ausgeglichen. Somit war eine „Überbestimmung“ der Verfeinerungsparameter jederzeit gewährleistet.

Verfeinerung mit X-PLOR und CNS Im Unterschied zu CCP4 und SHELX-97 bietet die aktuelle Version von CNS keine Möglichkeit der anisotropen Verfeinerung der Temperaturfaktoren und der Generierung von lokalisierten Wasserstoffatomen.

Die für die verschiedenen Verfeinerungszyklen verwendeten Einzeleingabeskripte sind in Abschnitt 3.9.1 beschrieben. Tabelle 4.7 gibt den Ablauf der Verfeinerung wieder.

Tabelle 4.7: Übersicht über die wichtigsten Stufen der Strukturverfeinerung des hoch aufgelösten Datensatzes mit CNS. WA: Gewichtungsfaktor zwischen den Röntgentermen und der stereochemischen Restriktionen. NW: Anzahl vollständig okkupierter Wassermoleküle. NX: Anzahl anderer Atome (Mg^{2+} , NADP, Acetophenon).

Schritt	Modell- und Verfeinerungsparameter	WA	NW/NX	R_{work} [%]	R_{free} [%]
1	Moleküldynamik und Energieminimierung, 20-1.4 Å	20	0/62	23.2	25.4
2	Wassergenerierung	20	126/62	22.0	23.2
3	Energieminimierung	20	126/62	19.3	21.5
4	Wassergenerierung	20	217/62	18.5	20.6
5	Energieminimierung, 20-1.10 Å	20	217/62	19.8	21.7
6	Wassergenerierung	20	269/62	19.7	21.5

Der verwendete Gewichtungsfaktor von 20 wurde vor den einzelnen Verfeinerungsrechnungen bestimmt. Der verwendete Wert entspricht einer hohen Gewichtung der Röntgenterme gegenüber den stereochemischen Restriktionen, denn die Übereinstimmung zwischen den aus dem Strukturmodell berechneten Strukturfaktoren F_c und den gemessenen Strukturfaktoren F_o war in dieser Phase der Verfeinerung schon sehr gut.

Eine Moleküldynamik kam nur im ersten Schritt der Verfeinerung zur Verwendung. In den folgenden Zyklen reichte eine Energieminimierung aus, da der Modellbau abgeschlossen war, also keine manuellen Veränderungen am Strukturmodell mehr vorgenommen wurden und somit keine lokalen Energieminima auftreten. Zudem konnte durch die Energieminimierung die Rechenzeit erheblich verringert werden.

Verfeinerung mit SHELX-97 SHELX-97 zeichnet sich durch seine große Flexibilität bei der Verfeinerung hochaufgelöster, makromolekularer Strukturen aus. Dies umfaßt unter anderem die Verfeinerung anisotroper Temperaturfaktoren für einzelne Residuen, die individuelle Justierung von stereochemischen Zwängen und Beschränkungen, die Verfeinerung der Besetzungszahlen multipler Konformationen oder die Generierung von Wassermolekülen mit Besetzungszahlen kleiner als 1. Sämtliche Rechnungen beinhalten eine Korrektur der diffusen Solvensanteile.

In der Ausgabedatei von SHELX-97 wird eine Liste aller Atome mit den Vorschlägen neuer multipler Konformationen ausgegeben. Dies erleichtert das Einfügen neuer Konformationen, was bei anderen Programmen graphisch oder mit Hilfe von Peaks in der Differenzelektronendichte erfolgen muss.

Im Unterschied zur Verfeinerung mit den zuvor diskutierten Programmpaketen, wird für SHELX-97 die Verwendung eines einheitlichen Gewichtungsfaktors von 0.1 vorgeschlagen (Sheldrick and Schneider, 1997). Statt dessen werden individuelle *Restraints* über die Kommandos DFIX, DANG, DEFS, FLAT, CHIV etc. definiert (siehe Eingabeskript in Abschnitt A.1.2). D.h. durch die Erhöhung der Standardabweichungen individueller stereochemischer Einschränkungen wird die hohe Datenqualität in der Verfeinerung berücksichtigt. Tabelle 4.8 faßt den Ablauf der Verfeinerung der R-ADH-Lb-Struktur mit SHELX-97 zusammen.

Tabelle 4.8: Übersicht über die wichtigsten Stufen der Strukturverfeinerung des hoch aufgelösten Datensatzes mit SHELX-97. NP: Anzahl der Proteinatome. NH: Anzahl der Wasserstoffatome. NW: Anzahl vollständig okkupierter Wassermoleküle. $NW_{1/2}$: Anzahl halb okkupierter Wassermoleküle. NX: Anzahl anderer Atome (Mg^{2+} , NADP, Acetophenon). N_{par} : Anzahl der *least square* Parameter.

Schritt	Modell- und Verfeinerungsparameter	NP/NH	NW/ $NW_{1/2}$ /NX	N_{par}	R_{worst} [%]	R_{free} [%]
1	Energienimmierung, 20–1.4 Å	1937/0	348/3/49	9533	18.3	21.6
2	anisotrope Temperaturfaktoren	1937/0	379/5/62	21446	13.9	17.9
3	Anpassungen in O und multiple Konformationen	1947/0	415/6/62	21585	13.1	17.7
4	Auflösung 20–1.10 Å	1947/0	411/6/61	21585	14.3	16.8
5	neue multiple Konformationen	1996/0	368/26/64	22071	13.7	16.4
6	Auflösung 20–0.99 Å, Wasser: B < 50 Å ²	1998/0	314/33/64	21445	14.7	17.3
7	kleinere Anpassungen, Generierung der Wasserstoffatome	2005/2005	316/33/64	21449	13.8	16.3
8	kleinere Anpassungen und Verfeinerung der multiplen Konformationen	2003/1981	321/33/64	21550	13.9	15.5

Alle Schritte der Verfeinerung umfassen neben der Energieminimierung auch die Suche nach definierten Wassermolekülen, deren Positionen gleichzeitig mitverfeinert wurden.

Die anisotrope Verfeinerung der Temperaturfaktoren wurde auf alle Proteinatome und einige Mg^{2+} -Ionen angewendet. Kosubstrat und Substrat konnten auf Grund der hohen Temperaturfaktoren und der geringen Besetzung – analog zur Verfeinerung mit CCP4 – nicht anisotrop verfeinert werden.

Im letzten Schritt wurde eine Verfeinerung der multiplen Konformationen eingeschlossen, was durch die Abnahme des freien R-Wertes gerechtfertigt ist.

4.1.10 Beschreibung und Diskussion der dreidimensionalen Struktur

4.1.10.1 Qualität des Modells und Vergleich der verschiedenen Verfeinerungsstrategien

Die Struktur der R-ADH-Lb wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst und bis zu einer maximalen Auflösung von 0.99 Å verfeinert.

Die Qualität der Modelle ist für alle drei Verfeinerungsmethoden ähnlich gut, was ein Vergleich einiger charakteristischer Daten für die verfeinerten Strukturen zeigt (siehe Tabelle 4.9).

Die R-Werte für das mit CNS erstellte Strukturmodell sind auf Grund der Verfeinerung ohne anisotrope Temperaturfaktoren und ohne Generierung von lokalisierten Wasserstoffatomen höher als bei den anderen beiden Methoden. Desweiteren zeigt die Superposition der drei Modelle für die Bereiche mit hohen Temperaturfaktoren für das mit CNS erstellte Modell die größten Unterschiede (siehe Abbildung 4.11). Dies liegt daran, dass die Verfeinerung unter Verwendung einer Moleküldynamik durchgeführt wurde (siehe Tabelle 4.7), was größere Verschiebungen im Strukturmodell zulässt, da das zu verfeinernde Modell möglicherweise lokale Minima verlassen kann (Brünger, 1992b), bzw. das Strukturmodell im Bereich hoher B-Faktoren schlechter definiert ist und mehrere Konformationen möglich sind. Besonders deutlich wird dies am N-Terminus, der flexibelen Aminosäure Ser141 und im Bereich der flexibelen Oberflächenschleife

Tabelle 4.9: Charakteristische Daten der endverfeinerten 3D-Struktur der R-ADH-Lb. Die R-Werte stammen aus der Ausgabe des jeweiligen Verfeinerungsprogramms, die Korrelationskoeffizienten aus der REFMAC-Ausgabe und die mittleren Temperaturfaktoren aus SFCHECK. Je negativer der *zp-comb*-Wert ist, desto besser ($zp-comb_{theoretisch} = -10.21$).

	CCP4	CNS	SHELX
R-Wert (20–0.99 Å) [%]	13.4	21.4	13.9
freier R-Wert (Testdatensatz: 5 % aller Reflexe) [%]	15.3	21.9	15.5
<i>zp-comb</i>	-10.52	-10.54	-10.58
Korrelationskoeffizienten zwischen $ F_{obs} $ und $ F_{calc} $	0.978	0.964	0.968
Mittlerer Temperaturfaktor [Å ²]	18.9	18.8	19.7
Anzahl der Wassermoleküle	389	185	354

von Thr192 bis Ala201 (siehe Abschnitt 4.1.10.1).

In den letzten Jahren wurden einige Strukturen mit R-Werten unter 10 % publiziert (Sheldrick and Schneider (1997), Housset et al. (2000), Longhi et al. (1997)). Allerdings stammen Strukturen mit einer so hohen Qualität meist von kleinen Proteinen mit kleinen Einheitszellen und Röntgendatensätzen mit weniger Reflexen (< 90 000). Nach Krebs (2000) nimmt der R-Faktor einer endverfeinerten Struktur mit der Größe der Einheitszelle und der Molekülgröße zu.

Die abschließenden $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten zeigen bei einer Konturierung von 1σ für alle Hauptkettenatome eine durchgehende und gut definierte Elektronendichte. Alle schon in Abschnitt 4.1.9 erwähnten problematischen Bereiche, wie der N-Terminus und die flexiblen Oberflächenschleife (Thr192–Ala201), konnten eindeutig identifiziert und interpretiert werden. Dies erlaubte, das Fehlen des N-terminalen Methionins durch die Struktur zu bestätigen (siehe Abschnitt 4.1.3.1) und die flexible Oberflächenschleife vollständig zu modellieren. Lediglich die Seitenketten der Reste Asp197 und Leu198 sind nicht vollständig definiert.

Nach Carugo and Bordo (1999) sollte die Anzahl der detektierbaren Wasser-

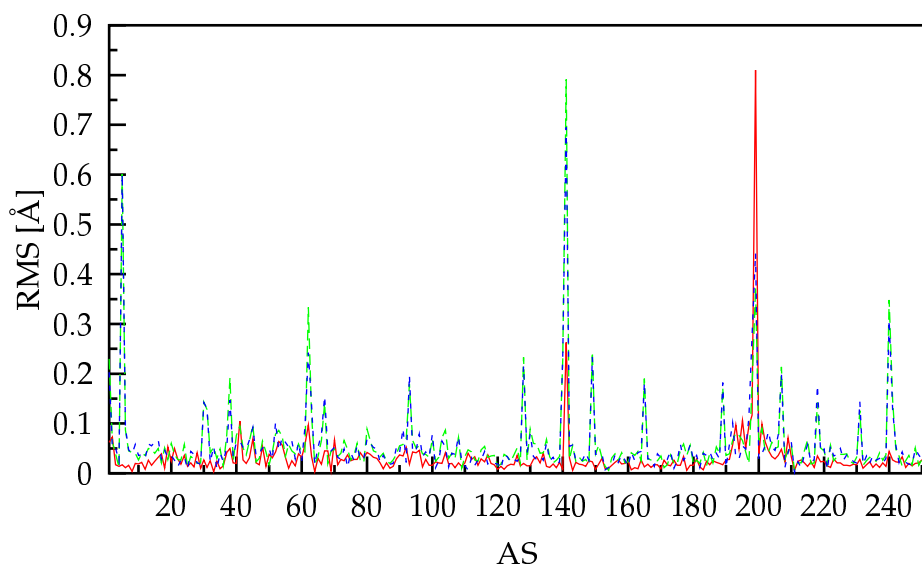


Abbildung 4.11: RMS-Abweichungen der C_{α} -Atome der drei R-ADH-Lb-Strukturen, verfeinert mit CCP4, CNS und SHELX-97. Die rote Kurve zeigt die RMS-Abweichungen zwischen der mit SHELX und der mit CCP4 verfeinerten Struktur ($\text{RMS} = 0.063 \text{ \AA}$), die grüne gepunktete Kurve zeigt die RMS-Abweichungen zwischen der mit SHELX und der mit CNS verfeinerten Struktur ($\text{RMS} = 0.097 \text{ \AA}$), die blaue gepunktete Kurve zeigt die RMS-Abweichungen zwischen der mit CCP4 und der mit CNS verfeinerten Struktur ($\text{RMS} = 0.094 \text{ \AA}$).

moleküle in einer Proteinkristallstruktur mit einer Auflösung von 1.0 \AA etwa 1.6–1.7 mal größer sein als die Anzahl der Aminosäuren im Protein. Bei einer Länge von 251 AS müssten somit ca. 400 bis 430 Wassermoleküle in der Struktur lokalisierbar sein. Die Anzahl der eingebauten Wassermoleküle in die hochaufgelöste Struktur ist jedoch etwas kleiner, da nur Wassermoleküle mit einem $\text{Sigmalevel} \geq 4$ und einem maximalen isotropen Temperaturfaktor $B_{\text{max}} \leq 50^2$ in das Modell eingebaut wurden. Die Autoren geben hingegen weder Grenzwerte für den Sigmalevel und B_{max} noch ein Abstandskriterium an.

Die Ergebnisse mit den verschiedenen Minimierungsalgorithmen MLKF (CCP4, CNS) und LSQF (SHELX-97) unterscheiden sich nur unwesentlich und lassen daher keine eindeutigen Schlüsse über die Qualität der Algorithmen für die Ver-

feinerung makromolekularer Strukturen hoher Auflösung zu. Alle Programme sind für die Verfeinerung von Proteinstrukturen entwickelt worden; SHELX-97 sollte lediglich für die Verfeinerung von Strukturen mit einer Auflösung von besser als 2.5 Å verwendet werden (Sheldrick and Schneider, 1997).

Die Qualität der Modelle wird eingehend im Folgenden Abschnitt diskutiert.

Alle Programmpakete sind modular aufgebaut, d.h. man verwendet für verschiedene Aufgabenstellungen verschiedene Unterrouтины bzw. Eingabeskripte. CNS ist einfach zu handhaben und klar dokumentiert. CCP4 setzt auf die individuelle Kombination vieler verschiedener Programme und ist umfangreich dokumentiert. SHELX-97 ist am flexibelsten bei der Justierung der Verfeinerungsparameter und bietet die meisten Verfeinerungsoptionen (z.B. multiple Konformationen). Eine umfassende Nutzung des Programms erfordert allerdings viel Erfahrung, da die Programmdokumentation sehr detailliert und etwas unübersichtlich ist und es an Eingabebeispielen in der Literatur mangelt.

Modellstatistik In Tabelle 4.10 sind die stereochemisch relevanten Größen der 3D-Strukturmodelle gegenübergestellt.

Die Geometrie des endverfeinerten Modells ist von guter Qualität. Die RMS-Abweichungen liegen zumeist etwas über den Standard RMS-Werten (Engh and Huber, 1991). Die Standardwerte stammen von Strukturdaten von Kleinmolekülen, die eine geringere Variationsbreite der stereochemischen Parameter aufweisen als hochaufgelöste Proteinröntgenstrukturen (Validation-Network (1998), siehe Abschnitt 2.2.3). So wird z.B. für den Torsionswinkel ω eine Standardabweichung von 6° statt der bisher verwendeten 3° vorgeschlagen.

Da die hohe Auflösung eine sehr präzise Bestimmung der Atompositionen zuließ, konnte mit weniger strengen stereochemischen Restriktionen verfeinert werden, was zwangsläufig zu größeren Abweichungen von den Standardwerten führte. Diese Gewichtung zwischen den stereochemischen Restriktionen und den gemessenen Röntgentermen wurde bereits im Abschnitt zur Strukturverfeinerung (4.1.9) diskutiert.

Die Qualität der Positionen der Atomkoordinaten ist am Beispiel der in Abbildung 4.12 dargestellten hochkonturierten Elektronendichten illustriert.

Die einzelnen Atome lassen sich in der Elektronendichte gut lokalisieren, was

Tabelle 4.10: Charakteristische stereochemische Größen der endverfeinerten 3D-Struktur der R-ADH-Lb. Verglichen sind die vorgegebenen Standardabweichungen $\sigma_Z(j)$ (Engh and Huber, 1991) mit den RMS-Abweichungen des endverfeinerten Modells von den idealen Geometriedaten. Die Werte wurden als Quadratwurzeln der mittleren Abweichungsquadrate $(Z_j^{ideal} - Z_{j,i}^{Modell})^2$ auf Basis des Endmodells und der vorgegebenen Idealwerte Z_j^{ideal} einer stereochemischen Observablen berechnet. Die Daten stammen aus REFMAC.

stereochemische Grösse	$\sigma_Z(j)$	realer RMS-Wert		
		CCP4	CNS	SHELX
interatomare Abstände:				
1,2-Abstände (Bindungslängen) [Å]	0.020	0.042	0.051	0.029
1,3-Abstände (Maß für die Bindungswinkel) [Å]	0.040	0.060	0.063	0.048
1,4-Abstände (Maß für die Torsionswinkel) [Å]	0.050	0.042	0.075	0.047
Chirales Volumen [Å³]	0.150	0.364	0.247	0.279
Kontakte zwischen nichtgebundenen Atomen:				
Wechselwirkungen über eine Torsion vermittelt [Å]	0.300	0.178	0.193	0.174
Wechselwirkungen über mehrere Torsionen vermittelt [Å]	0.300	0.318	0.295	0.292
planare Gruppen:				
Torsionswinkel ($\omega = 180^\circ$) [°]	3.0	6.2	6.2	6.1
Planarität der Peptidbindung (255 Gruppen) [Å]	0.030	0.035	0.037	0.033
Planarität der Aromaten (23 Reste) [Å]	0.020	0.021	0.024	0.020
Korrelation der Temperaturfaktoren:				
1,2-Nachbarn (Hauptkette) [Å²]	2.000	3.643	2.233	2.503
1,3-Nachbarn (Hauptkette) [Å²]	3.000	5.124	3.036	4.239
1,2-Nachbarn (Seitenkette) [Å²]	2.000	4.663	4.587	4.410
1,3-Nachbarn (Seitenkette) [Å²]	3.000	6.066	5.789	5.620

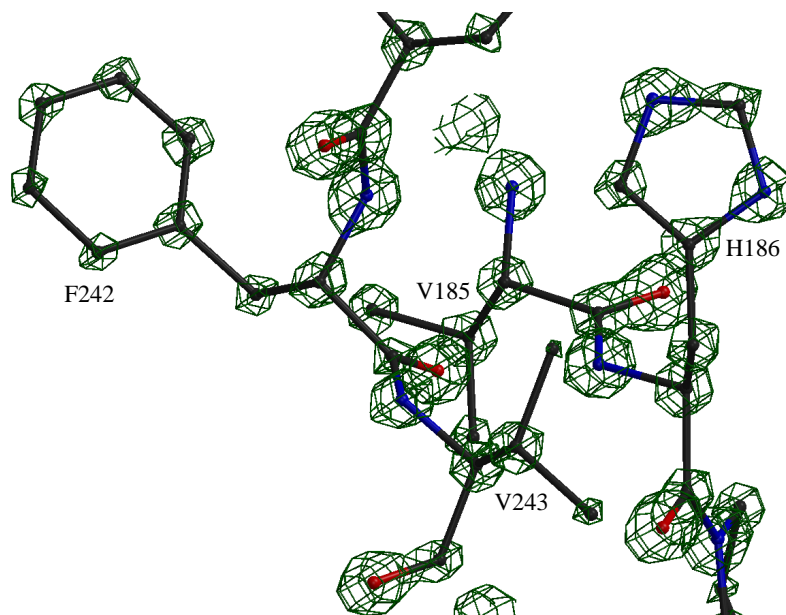


Abbildung 4.12: $2F_oF_c$ -Elektronendichten der Reste His186 und Phe242 bei 4σ . Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.

eine sehr genaue Bestimmung der Koordinaten bei atomarer Auflösung zuließ. Desweiteren lassen sich die Atomtypen, wie z.B. die C- und N-Atome vom Imidazolring in His186, in der Elektronendichte voneinander unterscheiden. Dieses Beispiel veranschaulicht die „Korrektheit“ der hochaufgelösten Struktur der R-ADH-Lb.

Die Verfeinerung mit den drei Programmpaketen wurde unter Anwendung stereochemischer Beschränkungen durchgeführt, die nicht für alle Protokolle vollkommen transparent und justierbar waren. Somit ist die Beurteilung und ein Vergleich der Verfeinerungsprotokolle und der Verfeinerungsergebnisse limitiert.

Ramachandran-Diagramm Das Ramachandran-Diagramm (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) veranschaulicht die Korrelation zwischen den Torsionswinkeln Φ und Ψ der Proteinhauptkette. Es gilt als bester Indikator für die „globale Korrektheit“ einer Struktur, da die Hauptkettentorsionswinkel während der Verfeinerung normalerweise beschränkt werden (Validation-Network, 1998). Die Winkel werden nach sterisch günstigen (erlaubten) bis sterisch ungünstigen

(verbotenen) Winkelbereichen differenziert. Eine Ausnahme bildet nur Gly, das wegen seiner kleinen Seitenkette sterisch sehr flexibel ist.

Die Auftragung in Abbildung 4.13 unterstreicht die gute stereochemische Qualität des Strukturmodells. Alle Nicht-Gly- und Nicht-Pro-Aminosäuren liegen in erweitert erlaubten Regionen. Die Statistik der Torsionswinkelverteilung ist in Tabelle 4.11 zusammengestellt.

Die Darstellung stammt von der mit SHELX-97 endverfeinerten Struktur. Die Statistiken sind für die anderen Strukturmodelle äquivalent.

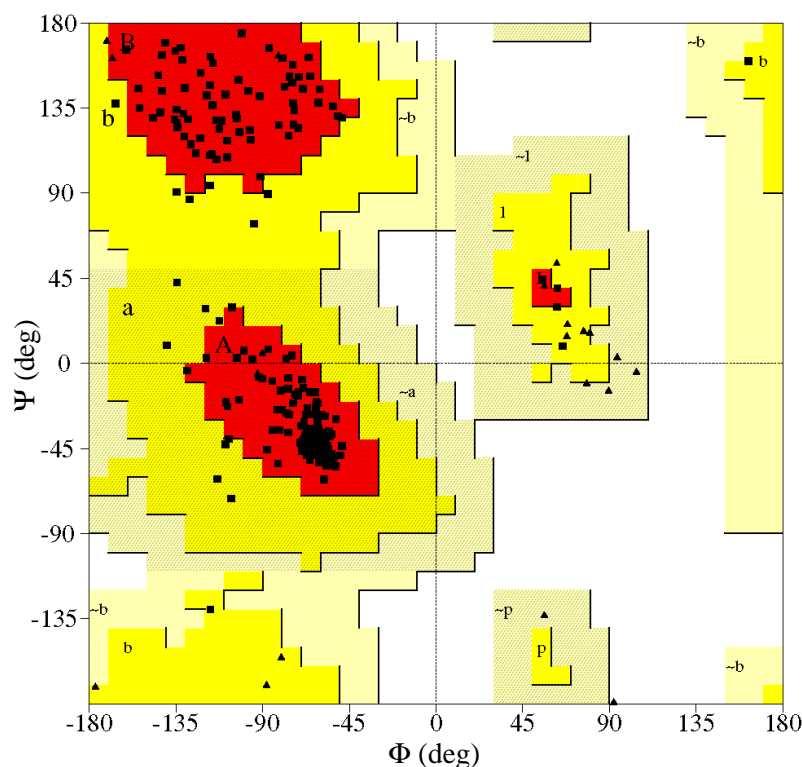


Abbildung 4.13: Ramachandran-Diagramm der mit SHELX-97 verfeinerten 3D-Struktur der R-ADH-Lb erzeugt mit PROCHECK. A, B, L: günstige Regionen, a, b, l, p: erweitert erlaubte Regionen, ~a, ~b, ~l, ~p: großzügig erlaubte Regionen, Glycine sind als Dreiecke dargestellt.

Luzzati-Diagramm Ein gängiges Mittel, um am Ende der Röntgenstrukturanalyse eines Proteins die mittleren Fehler der Atomkoordinaten abzuschätzen, ist

Tabelle 4.11: Statistik der Φ/Ψ -Torsionswinkelverteilung (Ramachandran-Diagramm). Die Statistik wurde mit dem Programm PROCHECK für die mit CCP4 endverfeinerte Struktur berechnet.

AS in erlaubten Regionen [A, B, L]	193	(90.6 %)
AS in erweitert erlaubten Regionen [a, b, l, p]	20	(9.4 %)
AS in großzügig erlaubten Regionen [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p]	0	(0.0 %)
AS in verbotenen Regionen	0	(0.0 %)
Anzahl Nicht-Gly- und Nicht-Pro-AS	213	(100 %)
Anzahl Gly (dargestellt als Dreiecke)	28	
Anzahl Pro	8	
Gesamtanzahl der AS	251	

die Auftragung des R-Wertes gegen die Auflösung nach ?). Abbildung 4.14 zeigt exemplarisch das Luzzati-Diagramm der mit SHELX-97 verfeinerten Struktur für alle Reflexe im Bereich zwischen 20 und 0.99 Å Auflösung. Die Abbildung enthält mehrere statistisch berechnete Kurven für verschiedene mittlere Koordinatenfehler.

Die Auftragung der experimentell bestimmten R-Werte bewegt sich nahezu durchgängig im Bereich unter 0.15 Å für den Atomkoordinatenfehler. Lediglich im Bereich niedriger Auflösung weicht die Kurve zu höheren Atomkoordinatenfehlern deutlich ab. Dies liegt daran, dass die niedrig aufgelösten Reflexe einen relativ hohen Anteil an Streustrahlung von ungeordneter Materie, wie z.B. nicht lokalisierter Wassermoleküle, enthalten. Bei den hoch aufgelösten Reflexen hingegen wirken sich die Ungenauigkeiten der Atomkoordinaten bei der Berechnung der $|F_{calc}|$ zunehmend stärker aus.

Die R-Werte konnten bei der Verfeinerung bis etwa 1.4 Å kontinuierlich verbessert werden. Bei der Hinzunahme der hochaufgelösten Reflexe bis 0.99 Å stiegen die R-Werte wieder an. Das Ansteigen der R-Werte bei hoher Auflösung liegt in der schlechter werdenden Qualität der Röntgendaten von 1.4 Å bis zur maximalen Auflösung. Für die Schale mit der höchsten Auflösung beträgt der R_{sym} -Wert 65.3 % (siehe Tabelle 4.4). Die Festlegung der Hochauflösungsgrenze wurde in

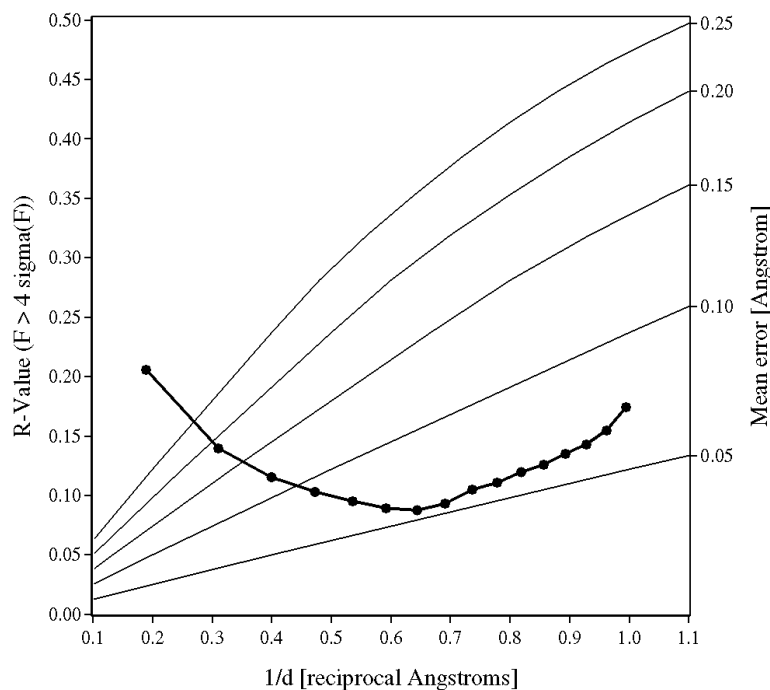


Abbildung 4.14: Luzzati-Diagramm der mit SHELX-97 verfeinerten 3D-Struktur der R-ADH-Lb, erzeugt mit SHELXPRO. Die fett gezeichnete Kurve zeigt den Verlauf des kristallographischen R-Wertes gegen die reziproke Auflösung und die dünnen Kurven zeigen die Auftragung der mittleren Atomkoordinatenfehler gegen die reziproke Auflösung. Es wurden sämtliche Reflexe im Auflösungs-bereich von 20 bis 0.99 Å verwendet. Jeder Punkt repräsentiert einen Auflösungs-bereich mit 2 185 (20–3.96 Å) bis 12 277 (1.02–0.99 Å) Reflexen.

Abschnitt 4.1.5 bereits diskutiert.

Temperaturfaktoren und Anisotropie Die Auftragung der mittleren isotropen Temperaturfaktoren (B) und der mittleren Anisotropie jeder Aminosäure der Hauptkette gegen die Sequenzposition legt die starren und beweglichen Abschnitte der 3D-Struktur offen (siehe Abbildung 4.15).

In Abbildung 4.16 ist das Monomer der R-ADH-Lb – mit einer Anfärbung nach den isotropen Temperaturfaktoren der Aminosäuren – gezeigt. Zum Vergleich ist in Abbildung 4.17 die R-ADH-Lb in einer ähnlichen Orientierung – mit einer

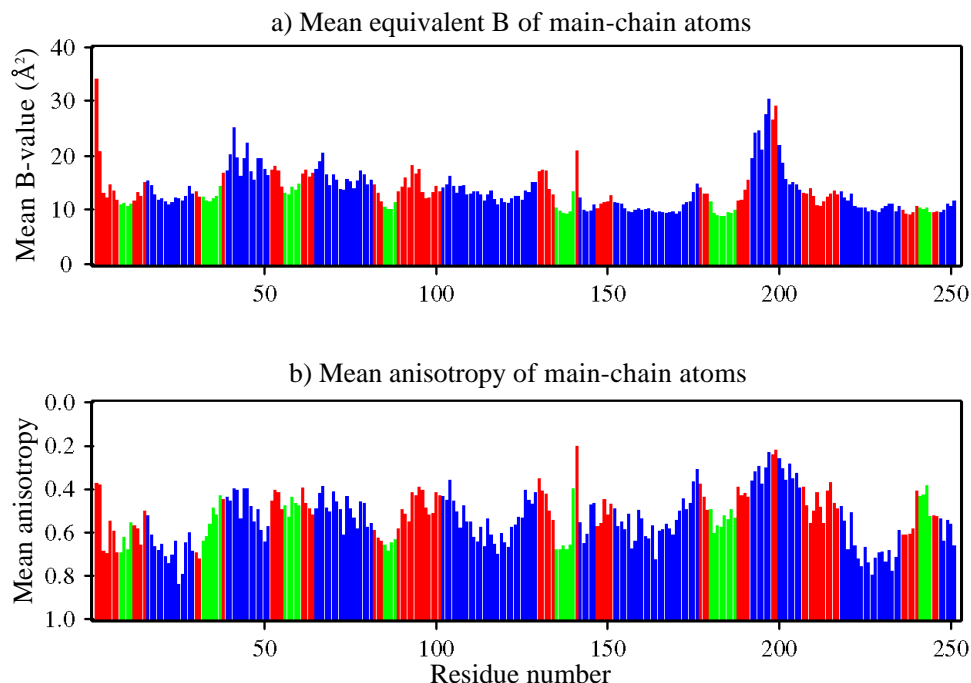


Abbildung 4.15: Auftragung der mittleren isotropen Temperaturfaktoren (a) und der mittleren Anisotropie der Hauptkette (b) gegen die Sequenzposition der 3D-Struktur der R-ADH-Lb. b: Eine mittlere Anisotropie von eins bedeutet perfekte Isotropie und eine mittlere Anisotropie von null würde theoretisch für Atome gelten, die nur in einer Raumrichtung schwingen. Die Abbildung wurde mit SHELXPRO erstellt. α -Helices sind blau, β -Faltblätter sind grün und die verbleibenden Sekundärstrukturbereiche sind rot dargestellt.

Anfärbung nach den isotropen Temperaturfaktoren der Atome – dargestellt.

Die Abbildungen zeigen, dass sich einige Bereiche in der Struktur als rigide Gruppen bewegen (z.B. α C und α FG1), d.h. die gerichtete Bewegung der Atome nicht unabhängig voneinander ist. Dies macht für in sich rigide Gebilde wie α -Helices oder β -Faltblätter auch Sinn.

Einen sehr hohen isotropen Temperaturfaktor zeigt das N-terminale Ser, das nicht fixiert ist und an der Oberfläche des Proteins liegt. Gleiches gilt für die beiden α -Helices Ser40–Val50 (α C), Glu66–Phe80 (α D) und die Loopregion zwischen Ile92–Lys96 (β D– α E) (siehe Tabelle 4.12).

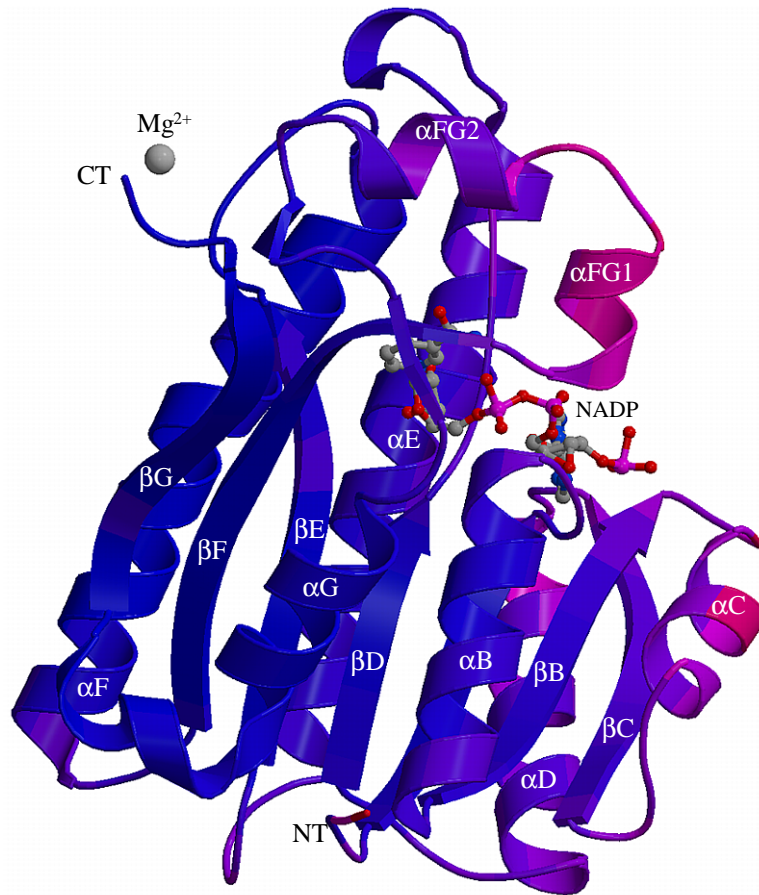


Abbildung 4.16: Monomer der R-ADH-Lb nach den mittleren isotropen Temperaturfaktoren der Aminosäuren angefärbt (ähnliche Orientierung wie in Abbildung 4.17). Reste mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau ($B_{min} = 10^2$) und Reste mit hohen Temperaturfaktoren sind rot ($B_{max} = 30^2$) gefärbt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Die Helices αC und αD befinden sich auf der „Außenseite“ des nativen Proteins, d.h. sie sind zum Lösemittel hin gerichtet und sind nicht an der Assoziation der Monomere beteiligt.

Der flexible Loop zwischen Ile92 und Lys96 liegt in der Spalte des aktiven Zentrums, ist somit solvenszugänglich und zeigt die strukturelle Anpassungsfähigkeit, die zur Bindung von Kosubstrat und Substrat nötig ist. Die hohen Temperaturfaktoren des Nicotinamidteils des Kosubstrates und das schlecht defi-

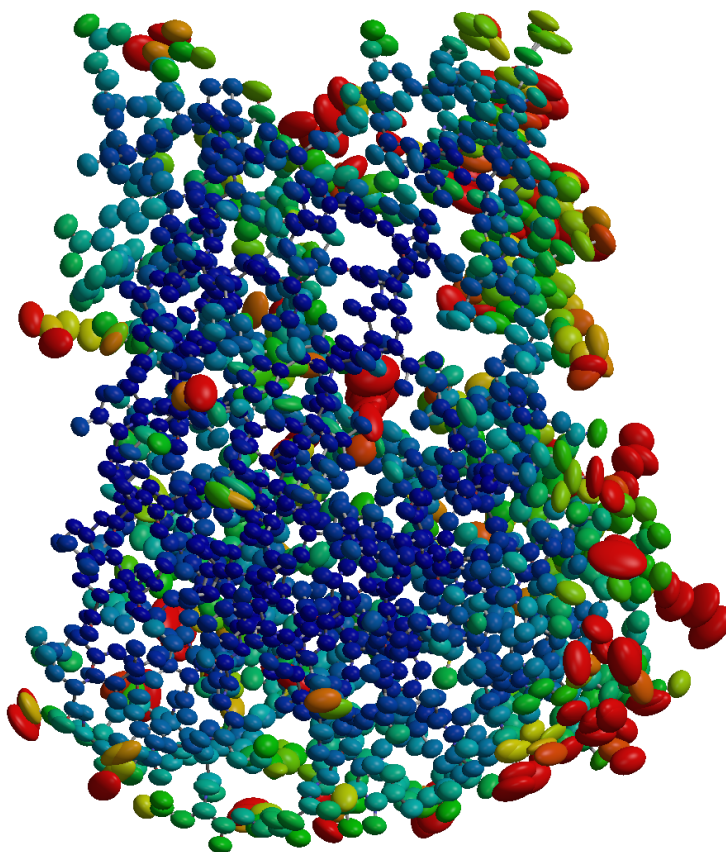


Abbildung 4.17: Monomer der R-ADH-Lb in Ellipsoiddarstellung (ähnliche Orientierung wie in Abbildung 4.16). Je größer die Elliptizität ist, desto größer ist die Anisotropie und je größer die Ellipsoide sind, desto größer ist der Temperaturfaktor des betreffenden Atoms. Die Atome sind nach den isotropen Temperaturfaktoren angefärbt. Atome mit niedrigen Temperaturfaktoren sind blau ($B_{min} = 10^2$) und Atome mit hohen Temperaturfaktoren sind rot ($B_{max} = 30^2$) gefärbt. Die Abbildung wurde mit RASTEP und RENDER erstellt.

nerte Substrat verdeutlichen gleichermaßen die Mobilität der Struktur in diesem Bereich.

Den höchsten mittleren isotropen Temperaturfaktor weist Ser141 auf (roter Bereich in der Mitte von Abbildung 4.17). Die Aminosäure bildet die Verbindung zwischen dem β -Faltblatt βE und der Helix $3_{10}a$. Die Aminosäure ist somit in

keine rigide Sekundärstruktur eingebunden und wird auch nicht durch räumlich nahe Reste stabilisiert, da sie an der Oberfläche der katalytischen Spalte lokalisiert ist.

Die beweglichste Region in der Struktur bildet der Bereich von Thr192 bis Ala201 (inkl. der Helices α FG1 und α FG2), die durch eine Schleife an der Oberfläche des Proteins über dem aktiven Zentrum gebildet wird. Dennoch konnte in diesem Bereich für den hoch aufgelösten Cryodatensatz eine durchgehende, gut definierte Elektronendichte lokalisiert und verfeinert werden.

Betrachtet man die Verteilung der mittleren isotropen Temperaturfaktoren der Hauptkette, so erkennt man deutlich die faltungsbestimmende Funktion der sieben parallelen β -Faltblätter, die die niedrigste Mobilität aufweisen. Die α -Helices weisen hingegen eine weitaus höhere Beweglichkeit auf, da sie eher an der Oberfläche des Proteins liegen. Die weniger mobilen Helices α E, α F und α sind hauptsächlich an der Dimerisierung zur Bildung des Homotetramers beteiligt.

Die Verfeinerung anisotroper Temperaturfaktoren war auf jeden Fall sinnvoll, da die Aminosäuren für alle Bereiche der Struktur eine deutliche Anisotropie aufweisen und eine isotrope Verfeinerung kein korrektes Bild der Mobilität der Reste wiedergeben würde (siehe Abbildung 4.15b und 4.17). Verglichen mit den mittleren isotropen Temperaturfaktoren schwankt die Verteilung der mittleren Anisotropie der Hauptkette nicht so stark. Sie weist jedoch generell dieselbe Tendenz wie die Temperaturfaktoren der Hauptkette auf, zeigt also in Bereichen hoher Temperaturfaktoren eine hohe Anisotropie.

Die Verteilung dieser Werte für die Seitenketten entspricht dem oben Beschriebenen. Die Temperaturfaktoren sowie die Anisotropie der Seitenketten zeigen lediglich für einzelne Aminosäuren mit langen flexiblen Seitenketten – wie Lys und Arg –, oberflächennahe Aminosäure oder in der katalytischen Spalte gelegene Aminosäuren hohe B -Faktoren. In beweglichen Teilen der Struktur zeigen die Seitenketten im Vergleich zur Hauptkette eine höhere Mobilität. Abbildung 4.18 illustriert dies beispielhaft für einige Aminosäureseitenketten.

Die Atome der Seitenketten weisen in diesen Beispielen eine deutlich ausgeprägtere Ellipsoidform auf als die Atome der Hauptkette. Je weiter die Atome der Seitenkette vom C_α -Atom entfernt sind, desto größer werden die Ellipsoide. Die

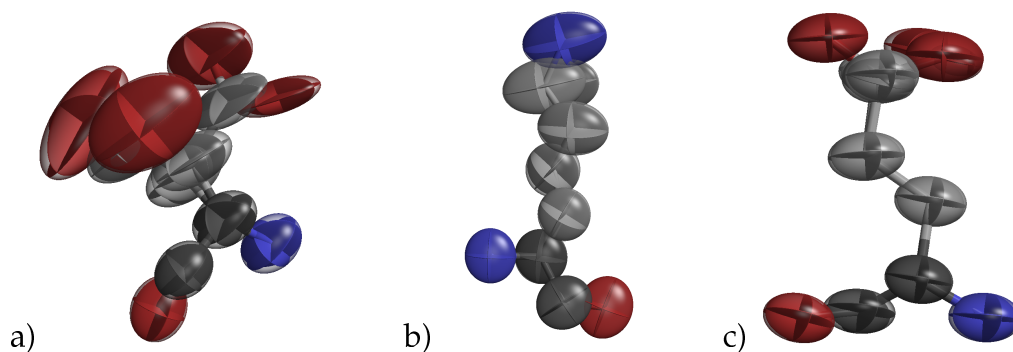


Abbildung 4.18: Ellipsoiddarstellung einzelner mobiler Aminosäuren. (a): Asp5 (multiple Konformation), (b): Lys131, (c): Glu203 (multiple Konformation). Je ausgeprägter die Elliptizität ist, desto größer ist die Anisotropie und je voluminöser die Ellipsoide sind, desto größer ist der Temperaturfaktor des betreffenden Atoms. Kohlenstoffatome sind grau, Stickstoffatome sind blau und Sauerstoffatome sind rot gefärbt. Die Abbildung wurde mit RASTEP und RENDER erstellt.

Hauptkette hat demnach die Funktion eines Scharniers, das die Verankerung für die mobilen Seitenketten bildet.

4.1.10.2 Globale Faltung

Das Monomer der tetrameren R-ADH-Lb hat eine parallele α/β -Eindomänenstruktur (siehe Abbildung 4.19) (Orengo et al., 1994). Sie wird aus sieben parallelen β -Strängen sowie elf α - und 3_{10} -Helices gebildet. Jedes Monomer kann ein Molekül NADP und ein Substratmolekül binden und enthält ein halbes Mg^{2+} -Ion.

Das zentrale β -Faltblatt, das aus den β -Strängen βA bis βG besteht, ist links gewunden und wird auf beiden Seiten von jeweils drei parallelen, ebenfalls links gewundenen α -Helices flankiert (αC , αB und αG auf der einen und αD , αE und αF auf der anderen Seite). Drei kürzere Helices ($\alpha FG1$, $\alpha FG2$ und $3_{10}c$) liegen etwas abseits von diesem Motiv. Die beiden Helices $\alpha FG1$ und $\alpha FG2$ bilden einen Teil der bereits erwähnten flexiblen Schleife über der Substratbindungsstelle. Die Helix $3_{10}a$ bildet den C-Terminus. Die Topologie des Monomers ist schematisch

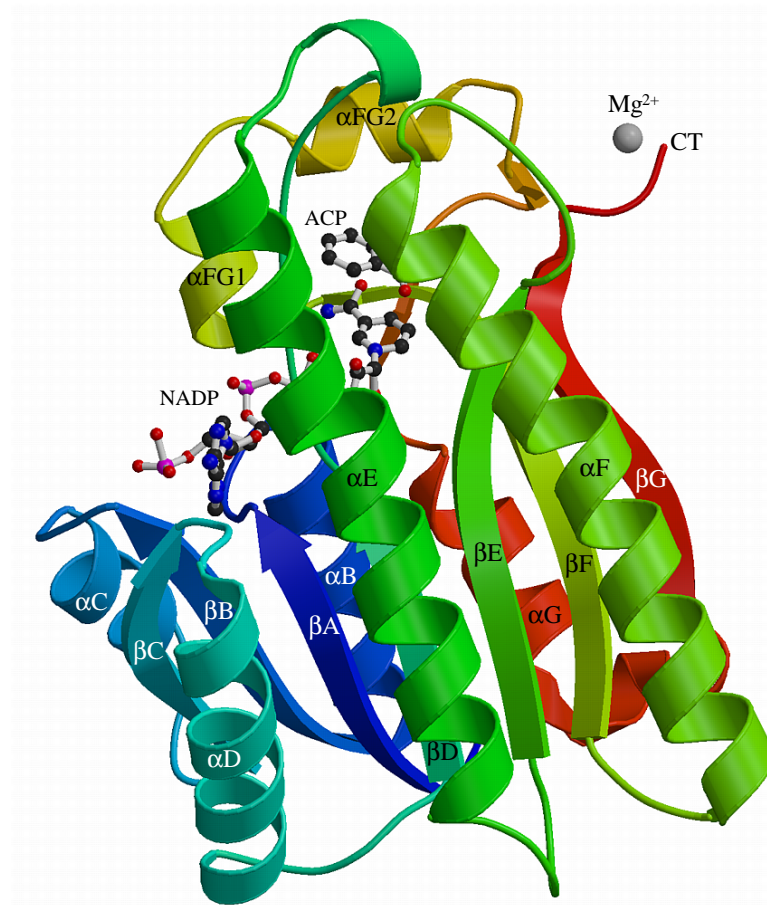


Abbildung 4.19: Monomer der R-ADH-Lb. Die Sekundärstrukturelemente sind mit einer Kennzeichnung versehen. Das Kosubstrat NADP ist als Stab- und Kugel-Modell und das Mg^{2+} -Ion als Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

in Abbildung 4.20 dargestellt.

Die aminoterminal Sequenz $\beta A-\alpha B-\beta B-\alpha C-\beta C-\alpha D-\beta D$ bindet das Kosubstrat NADP und liegt als *Rossmann-Faltung* vor (Rossmann et al., 1975). Das Motiv enthält zwischen der αB -Helix und dem βB -Strang einen engen und Gly-reichen Loop, der für dieses Faltungsmuster charakteristisch ist. Das C-terminale Motiv $\beta D-\alpha E-\beta E-3_{10}a-\alpha F-\beta F-\alpha FG1-\alpha FG2-\alpha G-3_{10}b-\beta G-3_{10}c$ und die zugehörigen Loopregionen sind für die quarternäre Assoziation und die Substratbindung verantwortlich.

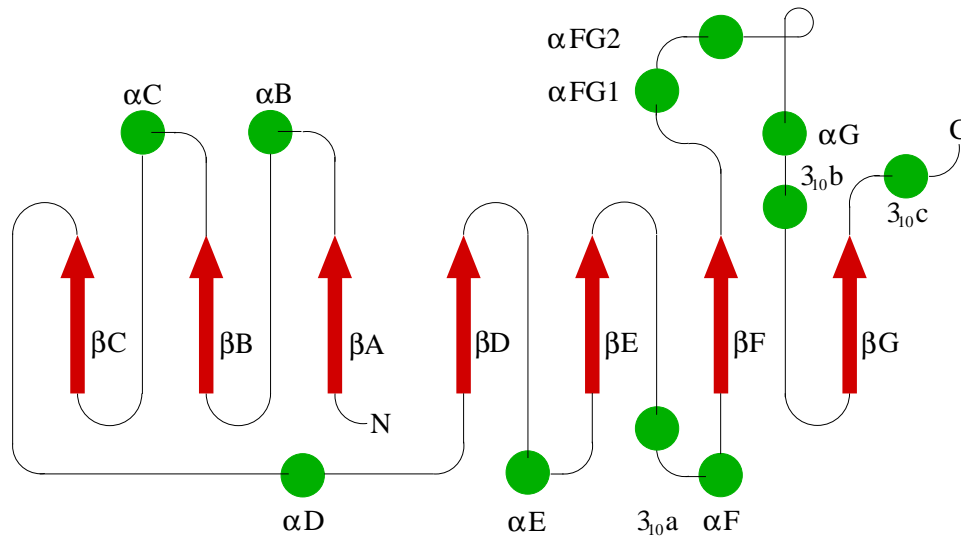


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Faltungstopologie des R-ADH-LbMonomers. Die Pfeile kennzeichnen die β -Stränge und die Kreise symbolisieren die α -Helices. Die Abbildung wurde mit XFIG erstellt.

Der überwiegende Teil der $\beta\alpha\beta$ -Motive formen Supersekundärstrukturen mit rechtshändiger Geometrie (Brändén and Jones, 1990). Bei diesem Motiv liegt die Helix, welche die parallelen β -Stränge verbindet, oberhalb der Ebene, die bei der Betrachtung der Faltblattstränge vom N-Terminus aus erkennbar ist. Wie in allen strukturell untersuchten SDR-Proteinen bilden die fünf N-terminalen $\beta\alpha\beta$ -Einheiten bis einschließlich βF rechtshändige *cross over*. Das letzte Motiv βF - αG - βG (mit einer langen Schleife, die $\alpha FG1$ und $\alpha FG2$ enthält) bildet einen seltenen linkshändigen *cross over*. Dadurch entsteht oberhalb des Faltblattes eine Bindungsstelle für die *re*-Seite des Nicotinamids. Dieser Teil des Kosubstrates wird bei der Bindung etwas von der Nucleotidfaltung wegbewegt, woraus die *syn*-Konformation der glykosidischen Bindung zwischen Ribose und Nicotinamid resultiert (Hülsmeier et al., 1998).

Neben den schon erwähnten α -Helices und β -Faltblättern enthält die R-ADH-Lb einige kurze 3_{10} -Helices (siehe Tabelle 4.12). Hinzu kommen die Loops $\alpha E\beta E$ (λE), $\alpha F\beta F$ (λF) und $\beta D\alpha E$, die als Typ I β -Turns bezeichnet werden (Guex and Peitsch (2000), Venkatachalam (1968)).

Tabelle 4.12: Sekundärstrukturelemente der R-ADH-Lb. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm DSSP nach der Methode von Kabsch und Sander (1983). Die erste Helix wird wie bei allen SDR-Proteinen mit B bezeichnet, um die Verwandtschaft zur Lactat-Dehydrogenase zu betonen. α : α -Helix, 3_{10} : 3_{10} -Helix, β : β -Strang.

Sequenzbereich	Bezeichnung	Sequenzbereich	Bezeichnung
Val8–Ile11	β A	Ile143–Gly145	3_{10} a
Gly17–Glu28	α B	Gly153–Leu175	α F
Lys32–Gly37	β B	Val180–Pro187	β F
Ser40–Val50	α C	Pro193–Asp196	α FG1
Ile56–Gln60	β C	Ala201–Met205	α FG2
Glu66–Phe80	α D	Pro219–Ala230	α G
Thr85–Asn88	β D	Asn232–Ser234	3_{10} b
Thr103–Met128	α E	Glu241–Val244	β G
Ala135–Met140	β E	Tyr248–Ala250	3_{10} c

4.1.10.3 Quartärstruktur und Kristallpackung

Die native Einheit der R-ADH-Lb ist ein Homotetramer mit einer Ausdehnung von etwa $60 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA}$. Die vier identischen Untereinheiten sind über eine 222-Symmetrie miteinander verbunden (siehe Abbildung 4.21).

Das Homotetramer hat eine lösemittelzugängliche Oberfläche von $29\,252 \text{ \AA}^2$, die für die Ausbildung von Kristallkontakten zur Verfügung steht. Bei einer Gesamtoberfläche des Monomers von $11\,486 \text{ \AA}^2$ bleiben somit $4\,131 \text{ \AA}^2$ für die Kontaktflächen innerhalb des Tetramers.

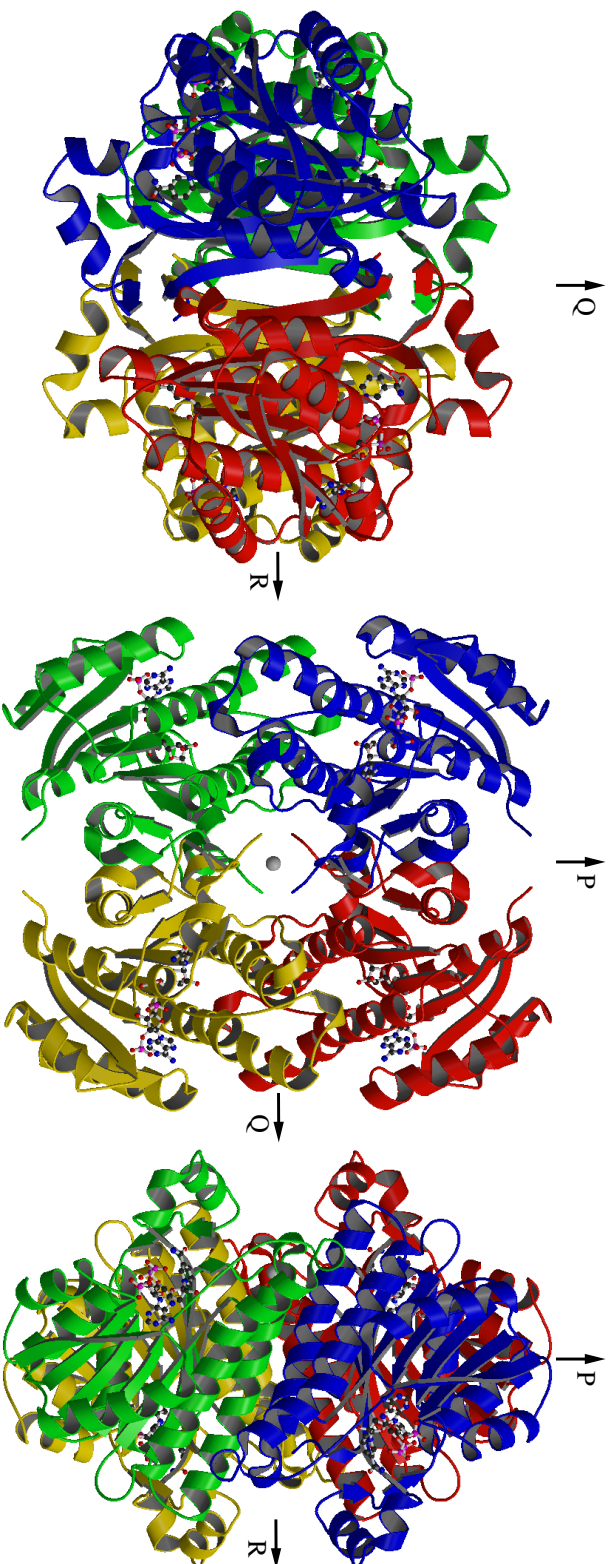


Abbildung 4.21: Homotetramer der R-ADH-Ib. Jedes Monomer ist unterschiedlich angefärbt. Monomer A: blau, B: rot, C: grün, D: gelb. Das Kosubstrat ist als Stab- und Kugel-Modell und die Mg^{2+} -Ionen sind als graue Kugeln dargestellt. Beide Mg^{2+} -Ionen liegen auf der R-Achse. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Zur Beschreibung der Kontaktflächen wird im Folgenden das von Rossmann et al. (1975) eingeführte P,Q,R-Koordinatensystem verwendet. Es handelt sich um ein rechtshändiges, orthogonales System, dessen Achsen mit der 222-Symmetrie der Dehydrogenasen in Einklang stehen und dessen Ursprung am gemeinsamen Schnittpunkt der Achsen im Zentrum des nativen Proteins liegt. Die Monomere A/B und B/C sind über die P-Achse, die Monomere A/C und B/D sind über die Q-Achse und die Monomere A/D und B/C über die R-Achse miteinander verbunden.

In Abbildung 4.21 liegt die P-Achse vertikal, die Q-Achse horizontal und die R-Achse ragt in die Papierebene hinein, wobei die beiden Mg^{2+} -Ionen genau auf der Symmetrieachse liegen. Durch die flache Anordnung der vier Monomere zueinander werden zwei große (P, Q) und eine kleinere Kontaktfläche (R) gebildet. Im Folgenden werden die drei Kontaktflächen im einzelnen diskutiert.

Kontaktfläche an der P-Achse Die Kontaktfläche an der P-Achse wird von den α G-Helices und den β G-Strängen der beteiligten Monomere A und B bzw. C und D gebildet. Neben einigen schwachen hydrophoben Interaktionen (Tyr224, Phe242, Val243, Val244), deren Abstände zu den Symmetriepartnern größer als 4 Å sind, bilden mit Phe236 und His215 zwei Aromaten der Symmetrieäquivalente ein Cluster.

Die effektivsten Kontakte bilden Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken. Abbildung 4.22 zeigt einen Ausschnitt der Kontaktstelle mit den intermolekularen Salz- und Wasserstoffbrücken. Sie verbinden fast ausschließlich die α G-Helices. Die antiparallelen β G-Stränge bilden nur eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe von Ser240 und dem Carbonylsauerstoff von Val243. Für weitere Interaktionen sind die Hauptketten der antiparallelen β G-Stränge der beiden Untereinheiten mit ca. 6–7 Å für direkte Kontakte zu weit voneinander entfernt und die Seitenketten sind jeweils ins innere der Monomere gerichtet. Die Verknüpfung findet über fixierte Wassermoleküle statt.

Neben oberflächennahen Wassermolekülen befinden sich in der Kontaktfläche eine Reihe von Wassermolekülen, die keinen Kontakt zur Proteinoberfläche haben und tief im Inneren der Kontaktfläche gelegen sind. Es ist anzunehmen, dass diese Wassermoleküle bei der Assoziation der Untereinheiten zwischen den

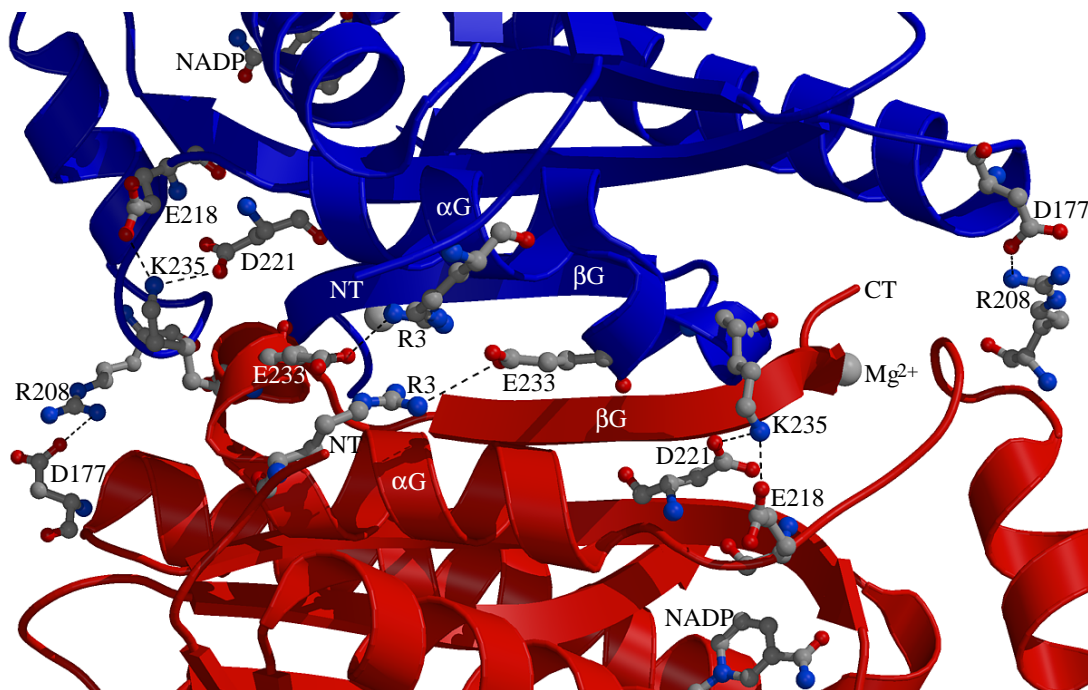


Abbildung 4.22: Kontaktstelle an der P-Achse im R-ADH-Lb-Tetramer. Monomer A: blau, B: rot. Das Kosubstrat ist als Stab- und Kugel-Modell und die Mg^{2+} -Ionen sind als Kugeln dargestellt. Gezeigt sind die intermolekularen Salz- und Wasserstoffbrücken. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Monomeren eingeschlossen wurden und einen wichtigen Beitrag zur Bildung der Quartärstruktur leisten.

Pro Untereinheit umfasst die Kontaktfläche an der P-Achse eine Fläche von $1\,667\text{ Å}^2$. Jones and Thornton (1996) diskutierten die Größe von Kontaktflächen in Abhängigkeit des Molekulargewichts der am Kontakt beteiligten Untereinheiten. Demnach sind die Kontaktfläche an der P- und der Q-Achse (siehe folgender Abschnitt) von der Größe her typische Kontaktflächen von Homodimeren mit einer durchschnittlichen Fläche von etwa $1\,600\text{--}1\,700\text{ Å}^2$ bei einem Molekulargewicht von 27 kDa.

Kontaktfläche an der Q-Achse Mit einer Fläche von 1715 \AA^2 bildet die Kontaktfläche an der Q-Achse die größte Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten des Tetramers.

Die Assoziation der Untereinheiten wird durch ein Vierhelix-Bündel, das aus je zwei α E- und α F-Helices aufgebaut ist, beherrscht. Die Assoziation über die α E-Helices wird hauptsächlich über intermolekulare Salz- und Wasserstoffbrücken gewährleistet. In Abbildung 4.23 ist die Kontaktfläche mit den intermolekularen Salz- und Wasserstoffbrücken dargestellt. Zusätzlich zu diesen hydrophilen Kontakten werden die beiden α E-Helices über starke hydrophobe Wechselwirkungen mit je zwei Trp108 und Phe118 zusammengehalten.

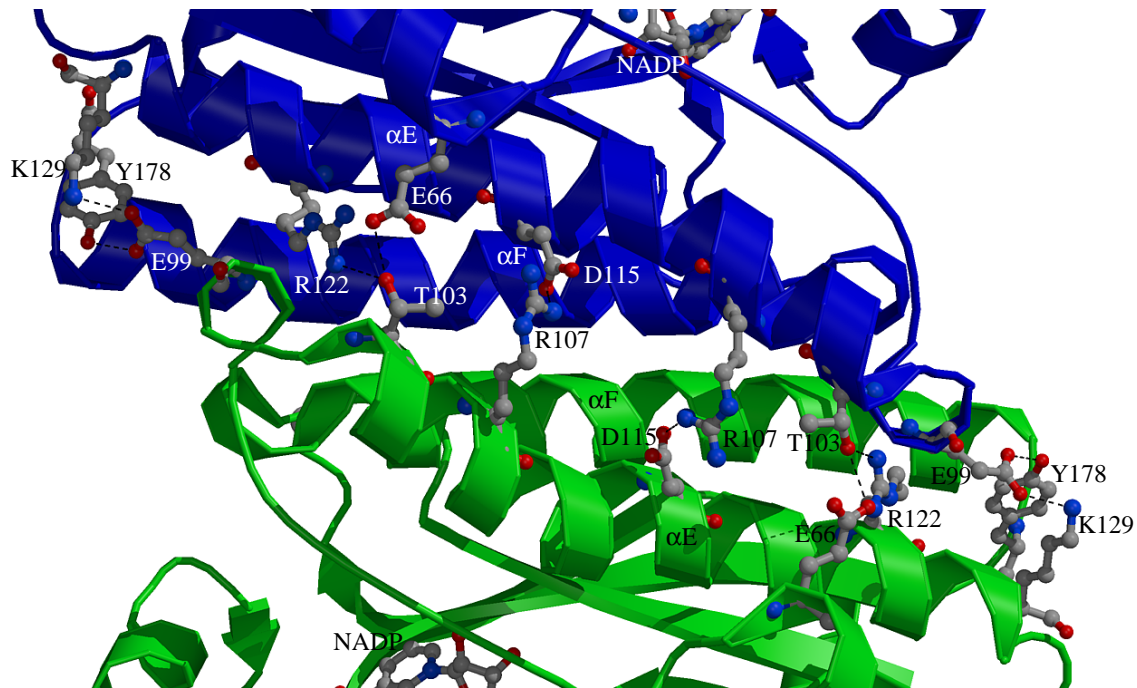


Abbildung 4.23: Kontaktstelle an der Q-Achse im R-ADH-Lb-Tetramer. Monomer A: blau, C: grün. Das Kosubstrat ist als Stab- und Kugel-Modell dargestellt. Gezeigt sind die intermolekularen Salz- und Wasserstoffbrücken. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Die Vermittlung der Kontakte über die beiden α F-Helices kommt durch hydrophobe und hydrophile Interaktionen des Proteinrückgrats zustande. Wechselwir-

kungen zwischen den Seitenketten können nur zwischen der Hydroxylgruppe von Ser168 und dem Sauerstoff der Amidgruppe von Asn156 beobachtet werden, da sich die Helices mit 3–4 Å sehr nahe kommen, so dass die Seitenketten von der Symmetrieachse abgewandt sind.

Kontakte zwischen Homodimeren sind generell hydrophoberer Natur als Kontakte in Heterokomplexen und der Anteil hydrophober Aminosäuren innerhalb der Kontaktfläche überwiegt (Jones and Thornton, 1996). Dies liegt daran, dass Homokomplex zumeist permanent sind und Heterokomplex nicht, wobei sich hydrophobe Aminosäuren an der Oberfläche nachteilig auswirken würden. Die Kontaktfläche an der Q-Achse, und in eingeschränktem Maß die im vorherigen Abschnitt diskutierte Kontaktfläche an der P-Achse, sind somit eher untypische Beispiele für Kontakte in Homodimeren. Möglicherweise hat sich das Homotetramer der R-ADH-Lb während der Evolution aus einem monomeren oder dimeren Vorläuferprotein gebildet, was durch die Tatsache unterstützt wird, dass SDR-Proteine auch als Homodimere vorkommen (17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase: Breton et al. (1996); *Drosophila* ADH: Benach et al. (1999); Troponinreduktase: Nakajima et al. (1998)).

Kontaktfläche an der R-Achse Auf Grund der oben erläuterten Geometrie des Homotetramers (siehe Abbildung 4.21) ist die Kontaktstelle an der R-Achse mit 791 Å² die schwächste von den drei Assoziationsflächen.

An der Ausbildung der Kontaktfläche sind keine direkten Kontakte zwischen den Aminosäuren der Untereinheiten beteiligt. Die markanteste Interaktion findet mit einem durch die C-terminalen Carboxylgruppen und vier Wassermolekülen oktaedrisch koordinierten Mg²⁺-Ion statt (siehe Abbildung 4.24). Die Koordination dieser harten Lewis-Säure Mg²⁺ durch harte Lewis-Basen wie Sauerstoff steht im Einklang mit der Klassifizierung biologisch relevanter Metallionen (Hughes and Poole, 1989).

Das Metallion liegt genau auf der Symmetrieachse. Folglich enthält jedes Monomer ein halbes Mg²⁺-Ion und das gesamte Tetramer zwei Mg²⁺-Ionen.

Zusätzlich wird der Kontakt über die R-Achse über ein Netz von Wasserstoffbrücken aus verbrückten lokalisierten Wassermolekülen vermittelt.

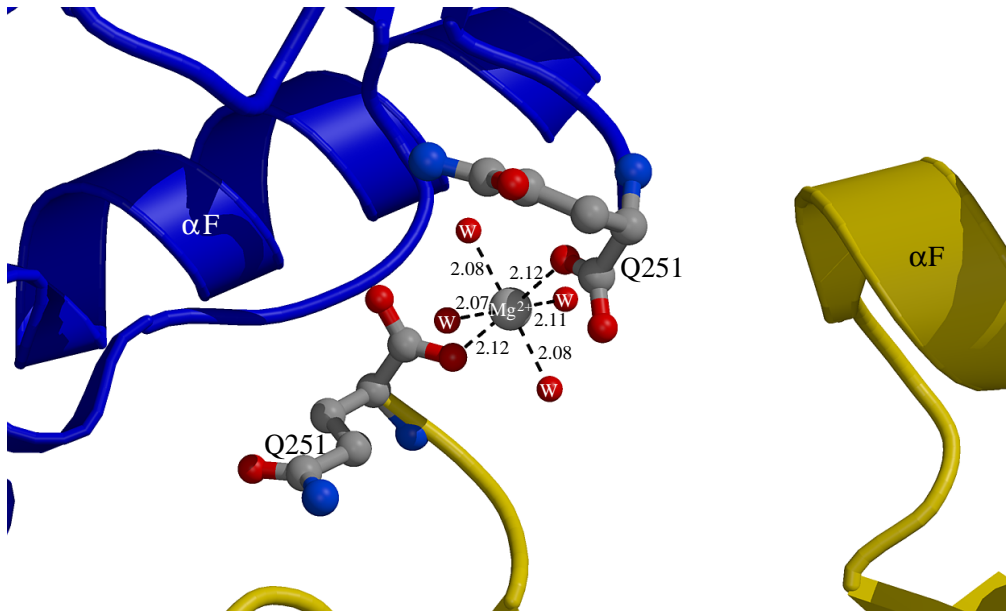


Abbildung 4.24: Kontaktstelle an der R-Achse im R-ADH-Lb-Tetramer. Monomer A: blau, D: gelb. Das Kosubstrat ist als Stab- und Kugel-Modell und das Mg^{2+} -Ion ist als Kugel dargestellt. Alle Abstände in Å. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

4.1.10.4 Markante Bereiche in der Struktur

Die R-ADH-Lb ist ein bakterielles, cytosolisches Protein. Sie enthält daher weder Disulfidbrücken noch ist das Enzym glykosyliert oder anderweitig posttranslational modifiziert.

Multiple Konformationen In der hochaufgelösten Struktur der R-ADH-Lb wurden 42 Reste (17 % aller Aminosäuren) mit multiplen Konformationen lokalisiert und verfeinert (siehe Tabelle 4.13). Der Anteil an Aminosäuren in multiplen Konformationen ist also nicht zu vernachlässigen, kann allerdings erst bei atomarer Auflösung (< 1.2 Å, Sheldrick (1990)) vollständig detektiert werden. Z.B. weist die 3D-Struktur vom Protein Crambin bei 0.83 Å 30 % aller Aminosäuren in diskreten Unordnung auf (Stec et al., 1995).

Besonders auffällig ist das gehäufte Auftreten von Met in multiplen Konformationen. Mit seiner langen, unverzweigten Seitenkette ist Met *per se* sehr beweglich

Tabelle 4.13: Reste mit multiplen Konformationen in der 3D-Struktur der R-ADH-Lb. N: Häufigkeit der AS im Protein, N_{mult} : Häufigkeit der AS in multiplen Konformationen, N_{rel} : Prozentualer Anteil multipler Konformationen an der Häufigkeit der AS.

AS	N	N_{mult}	N_{rel} [%]	AS	N	N_{mult}	N_{rel} [%]
Ala	25	1	4	Leu	16	3	19
Arg	8	1	13	Lys	17	3	18
Asn	11	2	18	Met	6	4	67
Asp	16	7	44	Phe	10	0	0
Cys	2	0	0	Pro	8	2	25
Gln	6	2	33	Ser	18	3	17
Glu	14	6	43	Thr	18	2	11
Gly	28	1	4	Trp	2	0	0
His	4	0	0	Tyr	6	1	17
Ile	16	0	0	Val	20	1	5

und kann auf Grund des geringen Dipolmoments keine so starken hydrophoben Wechselwirkungen, wie z.B. Val und Leu, eingehen. Dennoch ist der Dipol nicht stark genug, um eine Fixierung über Wasserstoffbrücken zu erreichen, wie dies z.B. bei Lys und Arg möglich ist (Schulz and Schirmer, 1990).

Die Seitenketten der sauren Aminosäuren Asp und Glu zeigen ebenfalls eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung multipler Konformationen. Der überwiegende Teil dieser Reste wird durch Wasserstoffbrücken fixiert, da die Anzahl der möglichen Salzbrücken durch die geringer Anzahl basischer Aminosäuren begrenzt ist oder die Reste nicht in räumlicher Nähe zueinander liegen.

In den flexiblen oder in den solvenszugänglichen Bereichen der Struktur treten auch die weniger flexiblen Aminosäuren Gly, Pro oder Tyr in multiplen Konformationen auf. In Abbildung 4.25 sind einige Beispiele multipler Konformationen abgebildet.

Im allgemeinen haben die Reste mit multiplen Konformationen hohe Temperaturfaktoren und eine ausgeprägte Anisotropie. Das bedeutet, dass ein ständiger

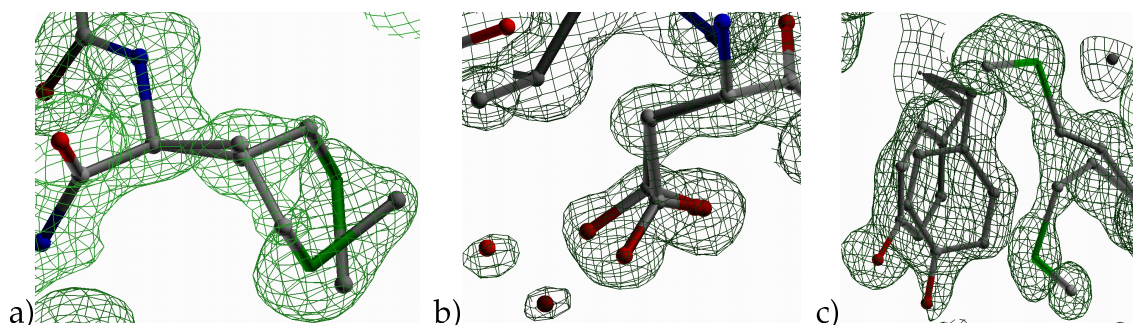


Abbildung 4.25: $2F_oF_c$ -Elektronendichte multipler Konformationen der R-ADH-Lb. a: Elektronendichte von Met140 bei 2.2σ , b: Elektronendichte von Asp149 bei 1.9σ , c: Elektronendichte von Tyr189 und Met205 bei 1.3σ . Die Abbildung wurde mit dem Programm O erstellt.

Wechsel zwischen den Konformationen stattfindet. Eine Häufung multipler Konformationen konnte in den schon diskutierten Bereichen (siehe Seite 105ff) am N-Terminus, in der Nähe des aktiven Zentrums und in der flexiblen Oberflächenschleife beobachtet werden. Eine Ausnahme bildet z.B. Met205, das in zwei gut definierten Konformationen auftritt (siehe Abbildung 4.25c).

Flexible Oberflächenschleife In diesem Bereich der Struktur (Thr192 bis Ala201) konnten die meisten Reste in multiplen Konformationen lokalisiert werden. Die hohen Werte für die isotropen Temperaturfaktoren und die Anisotropie wurden bereits auf Seite 107 diskutiert. Sowohl für die Hauptkette als auch für die Seitenketten konnte, trotz der relativ geringen Fixierung der Atome, eine durchgehende Elektronendichte verfeinert und somit alle Reste lokalisiert werden (siehe Abbildung 4.26).

Abgesehen von Leu198 ist mit einer Konturierung von 1σ für alle Seitenketten in der flexiblen Schleife eine Elektronendichte sichtbar. Bei niedrigerer Konturierung ($0.6\text{--}0.8\sigma$) konnte auch für diese Seitenkette eine interpretierbare Elektronendichte lokalisiert werden.

In einer Reihe von verwandten Proteinen konnte dieser flexible Bereich ebenfalls gefunden werden (Ghosh et al. (1994), Tanaka et al. (1996b), Tanaka et al. (1996a), Nakajima et al. (1998), Hülsmeier et al. (1998)), wenngleich diese Region in den

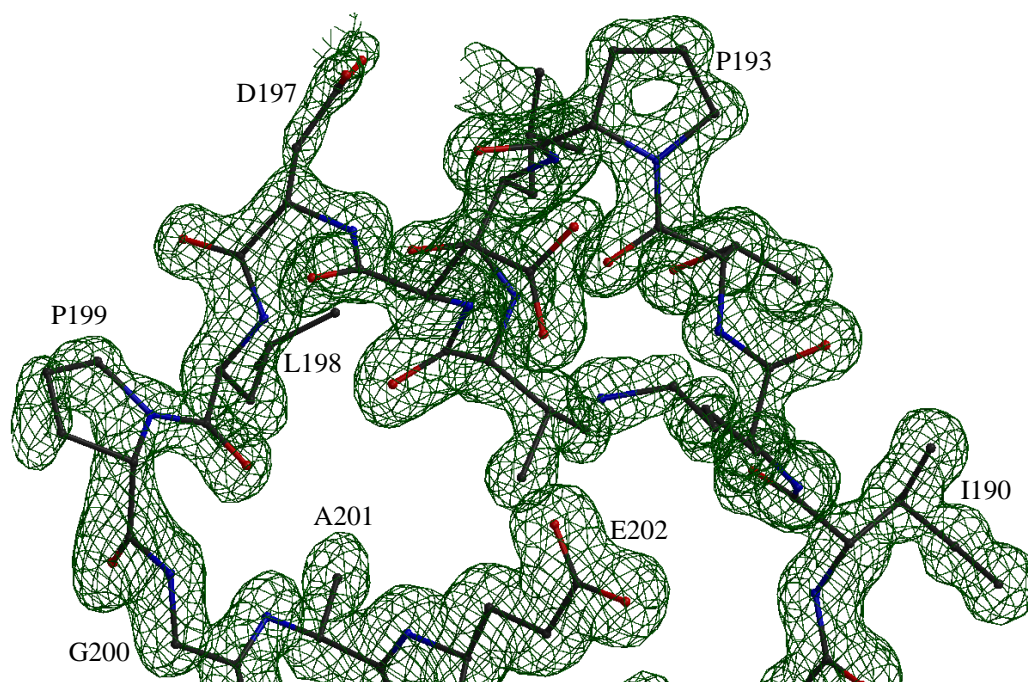


Abbildung 4.26: $2F_oF_c$ -Elektronendichte der flexiblen Oberflächenschleife bei 1σ . Der gezeigte Bereich umfasst den Bereich von Ile190 bis Glu202. Um die Übersicht zu verbessern, wurde auf die Darstellung multipler Konformationen verzichtet. Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt.

verschiedenen Proteinen eine sehr unterschiedliche Länge mit etwa 12–30 Resten aufweist (\sim AS248–AS280 in Abbildung 4.34).

In der Familie der SDR-Proteine beinhaltet dieser sogenannte „Substratbindungs-loop“ ein oder zwei kurze Helices (R-ADH-Lb: α FG1 und α FG2). Für die 7α -Hydroxysteroiddehydrogenase konnte eine substratinduzierte Bewegung nachgewiesen werden. Dabei schwingt der gesamte Loop, wie an zwei Scharnieren aufgehängt, um bis zu 8.5 \AA von einer 'interaktiven' in eine 'katalytische' Form und umgekehrt. Die Konformationen des überwiegenden Teils des Loops bleiben dabei unverändert (Tanaka et al., 1996b).

Mg²⁺-Bindungsstellen Die R-ADH-Lb ist – abgesehen von der R-ADH aus *Lactobacillus kefir* (Sequenzidentität: 93 %, Riebel (1996)) – das bisher einzige Enzym

aus der SDR-Familie, für das eine metallionenabhängige Aktivität beschrieben ist. Die beiden Mg^{2+} -Ionen in der nativen Einheit (Homotetramer) der R-ADH-Lb befinden sich in einer Kontaktstelle zwischen den Monomeren (siehe Seite 118f und Abbildung 4.24). Sie haben keinen direkten Kontakt zum aktiven Zentrum und sind somit nicht direkt an der Katalyse beteiligt. Ihre Bedeutung besteht in der Aufrechterhaltung der Quartärstruktur, indem sie den Hauptbeitrag zur Assoziation an der R-Achse leisten. Die an eine tetramere Quartärstruktur gekoppelte Enzymaktivität gilt für alle Vertreter dieser Gruppe von Enzymen (Reid and Fewson (1994), Carrea and Riva (1984)).

Werden die Mg^{2+} -Ionen aus dem Protein entfernt, so verliert das Enzym irreversibel seine Aktivität, da die R-ADH-Lb nur als Tetramer aktiv ist (Riebel, 1996). Allerdings kann die Aktivität des Proteins alternativ durch Zugabe von Mn^{2+} -Ionen, das einen ähnlichen Ionenradius hat, aufrechterhalten werden (Robson and Garnier, 1988). Der Austausch gegen Ca^{2+} -Ionen ist nicht möglich (Riebel, 1996).

Die zweite Gruppe der Dehydrogenasen, die *medium chain dehydrogenases* (MDR), enthalten in den meisten Fällen ein Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum (?), Persson et al. (1994)). Die *long chain dehydrogenases* (LDR) bilden die dritte Untergruppe der Dehydrogenasen und werden durch Eisen aktiviert (Conway et al. (1987), Inoue et al. (1989)). In keiner dieser beiden Untergruppen wurde eine Beteiligung von Metallionen zur Bildung der Quartärstruktur beobachtet.

4.1.10.5 Kosubstrat- und Substratbindung

Nach der Verfeinerung der 3D-Struktur der R-ADH-Lb war unklar, ob die ermittelte Konfiguration der Kosubstratbindungsstelle und des aktiven Zentrums die wirklichen Verhältnisse richtig wiedergibt. Sowohl NADP als auch Acetophenon zeigten schlecht definierte Elektronendichten und hatten sehr hohe Temperaturfaktoren (siehe Abbildung 4.27). Eine hohe Mobilität des Kosubstrates wird auch in anderen SDR-Strukturen beobachtet (Hülsmeier et al., 1998).

Die Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums sind in der Elektronendichte gut definiert, jedoch ist bei einer Konturierung von 2.5σ für NADP und Acetophenon keine Elektronendichte mehr zu erkennen. Ein Strukturalignment der

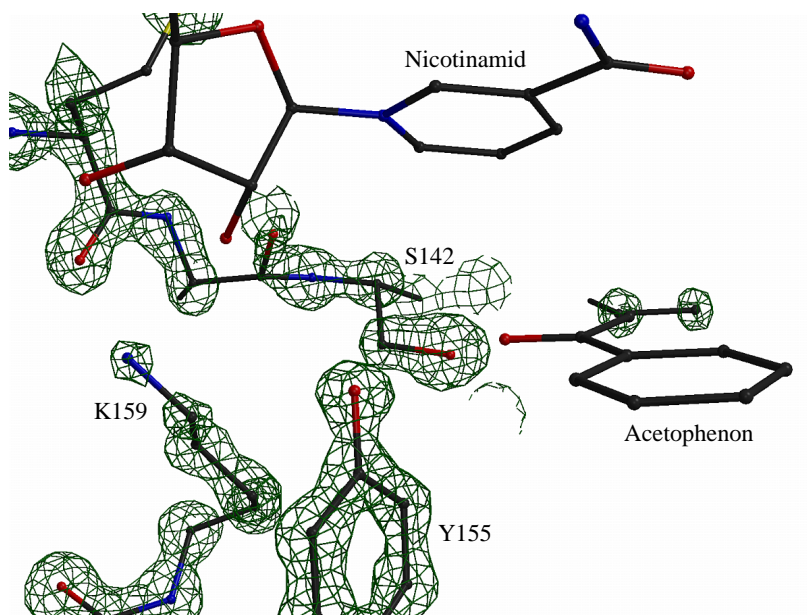


Abbildung 4.27: F_oF_c -Elektronendichten des katalytischen Zentrums bei 2.5σ .
Die Abbildung wurde mit BOBSCRIPT und RENDER erstellt

R-ADH-Lb mit 3D-Strukturen anderer SDR-Proteine sollte zeigen, ob NADP und Acetophenon in richtiger Weise in der Bindungstasche angeordnet sind. Der Ausschnitt der Kosubstratbindungsstelle und des aktiven Zentrums der mit STAMP alignierten Strukturen ist in Abbildung 4.28 dargestellt.

Neben dem Kosubstrat NAD(P) und dem Substrat zeigt die Abbildung die bei SDR-Proteinen streng konservierten Aminosäuren Ser142, Tyr155 und Lys159 (R-ADH-LbNomenklatur) (Jörnvall et al., 1995). Noch vor der Veröffentlichung der ersten 3D-Struktur eines SDR-Proteins vermuteten Persson et al. (1991), dass diese Reste für die Katalyse von entscheidender Bedeutung sein könnten.

Alle Strukturen weisen dieselbe räumliche Anordnung in diesem Bereich der Struktur auf. Das Kosubstrat ist in einer gestreckten Konformation gebunden, d.h. der Adenin- und der Nicotinamidring bilden die beiden Enden der langen Achse des Kosubstrates. Weiterhin befindet sich der Nicotinamidring in *syn*-Konformation, was eine räumliche Nähe zwischen der Säureamidgruppe und dem Phosphatrückgrat zur Folge hat. Auf die Bedeutung dieser Konformationen wird später noch genauer eingegangen.

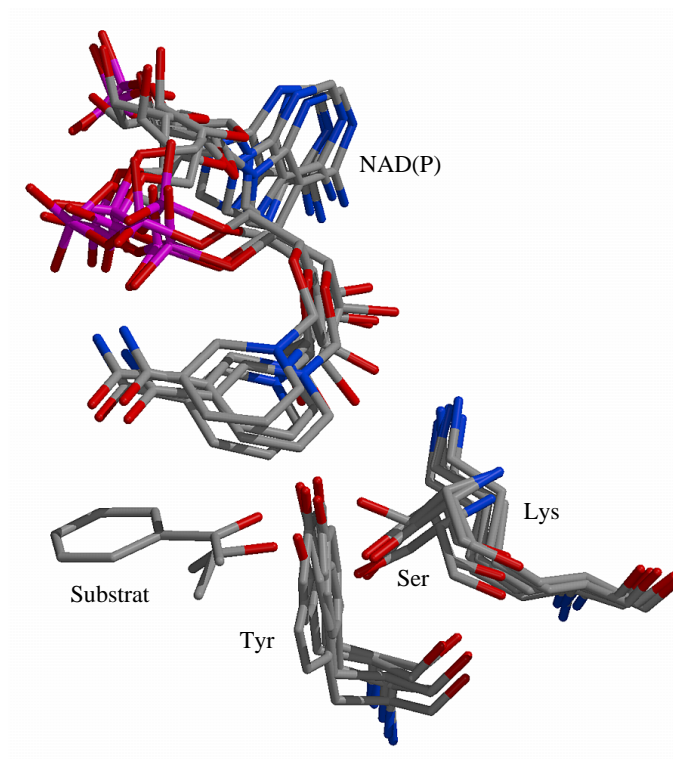


Abbildung 4.28: Superposition der NAD(P)-Bindungsregionen bekannter SDR-Strukturen. Gezeigt sind das Kosubstrat und die Ser-Tyr-Lys-Triade. Die Strukturen wurden mit STAMP aligniert. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

NADP und Acetophenon befinden sich in der Struktur der R-ADH-Lb also in der korrekten Position innerhalb der Bindungstasche, unterstützt durch die Tatsache, dass die hier diskutierte Konfiguration in der katalytischen Spalte durch die biochemischen Daten (z.B. R-Spezifität, siehe Seite 129) und mechanistische Überlegungen belegt wird (siehe Abschnitt 4.1.10.6). Ausgehend von diesem Ergebnis wurden alle weiteren Analysen der Kosubstratbindungsstelle und des aktiven Zentrums durchgeführt.

Adenin-Ribose-Teil Die Fixierung des Kosubstrates findet in erster Linie über den Adenin-Ribose-Teil des Kosubstrates statt, der weniger mobil als der Nicotinamid-Teil ist und stärker am Protein fixiert ist.

Die Bindungsstellen an das Protein befinden sich an den *Turns* $\beta A-\alpha B$, $\beta B-\alpha C$, am C-Terminus von βC und dem mittleren Bereich von αE . Diese Sekundärstrukturelemente bilden den „Hohlraum“, in dem der Adenin-Ribose-Teil fixiert wird. Die Wechselwirkungen mit dem Protein sind in erster Linie hydrophober Natur. Die wichtigsten Reste für die Bindung des Adenin-Ribose-Teils sind in Abbildung 4.29 dargestellt.

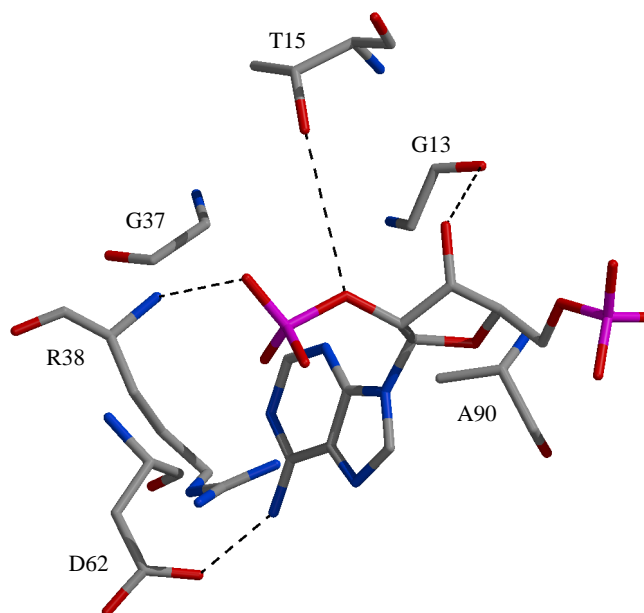


Abbildung 4.29: Adenin-Ribose-Bindestelle des NADP an die R-ADH-Lb. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Zwischen der Carboxylgruppe des Asp62 und der Aminogruppe des Adenins wird eine Wasserstoffbrückenbindung gebildet. Diese bei SDR-Proteinen stark konservierte Aminosäure (siehe Abbildung 4.34) stabilisiert gleichzeitig den Loop zwischen βC und αD und stellt die äußere Begrenzung der hydrophoben Bindungstasche dar.

Der Adeninring ist eingeschlossen zwischen den Seitenketten von Arg38 und Ala90, die über hydrophobe Interaktionen mit dem Imidazolring interagieren. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer Wasserstoffbrücken, die in Abbildung

4.29 durch gestrichelten Linien angedeutet sind und für die Fixierung der Ribose sorgen.

Phosphatrückgrat Wie in allen bekannten 3D-Strukturen enthält die R-ADH-Lb das charakteristische Gly-reiche Motiv GXXXGXXG (Gly13–Gly19) des N-Terminus in einem *Turn* zwischen β A und α B. An dieser Stelle wird der Pyrophosphatteil des Kosubstrates gebunden. Ein Teil dieser Sequenz ist in Abbildung 4.30 gezeigt.

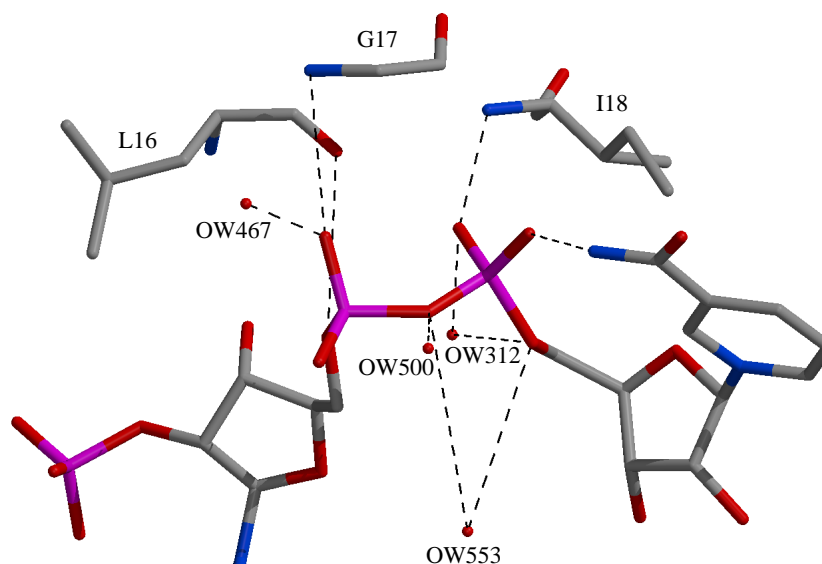


Abbildung 4.30: Bindestelle des Pyrophosphatteils des NADP an die R-ADH-Lb. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet. Wassermoleküle (OW) sind als rote Kugeln dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Zusätzlich zu den Interaktionen über Wasserstoffbrücken mit dem Proteinrückgrat findet eine Stabilisierung des Phosphatrückgrats über mehrere Wasserstoffbrücken mit lokalisierten Wassermolekülen statt.

Nicotinamid-Ribose-Teil Ein Netzwerk aus sechs Wasserstoffbrücken hält den Nicotinamid-Ribose-Teil des NADP fest. Dieses Muster unterscheidet sich nur unwesentlich von der Fixierung in anderen SDR-Proteinen. Zusätzlich wird der

Nicotinamidring durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff der Säureamidgruppe und dem Phosphatrückgrat in der *syn*-Konformation verankert (siehe Abbildung 4.31).

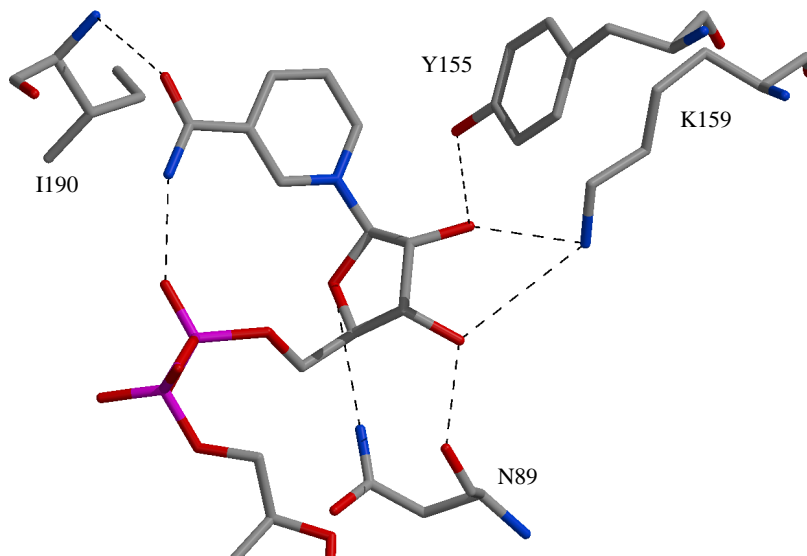


Abbildung 4.31: Nicotinamid-Ribose-Bindestelle des NADP an die R-ADH-Lb. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Kosubstratspezifität Alle biochemisch bisher untersuchten SDR-Proteine zeigen eine eindeutige Spezifität entweder für NAD oder für NADP. Für die Bevorzugung von NAD oder NADP wird im wesentlichen die Rolle von drei Aminosäuren postuliert (Tanaka et al. (1996a), siehe Tabelle 4.14).

Für die R-ADH-Lb sind dies die Aminosäuren in den Positionen 16, 37 und 38 in unmittelbarer Nähe der Adeninribose. Demnach sollte sich für NADP-bevorzugende Proteine in Position 16 ein Lys oder ein Arg befinden, was für die R-ADH-Lb nicht zutrifft, da sich an dieser Stelle ein Leu befindet. Für die Positionen 37 wird für NAD-bindende Proteine ein Asp und für NADP-bindende eine kleine Aminosäure - bei der R-ADH-Lb ein Gly - erwartet. Position 38 sollte bei NADP-Bevorzugung ein Arg - das auch in der R-ADH-Lb gefunden wird -

Tabelle 4.14: Reste, die die Kosubstratspezifität der SDR-Proteine beeinflussen (Postulat). Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der Nomenklatur der R-ADH-Lb. Die nach Tanaka et al. (1996a) für die Bevorzugung entscheidenden Reste sind in Spalte zwei und drei und die in der R-ADH-Lb an der angegebenen Position gefundenen Reste in Spalte vier aufgelistet. Nähere Erläuterungen im Text.

Position	NAD-abhängig	NADP-abhängig	R-ADH-Lb
16	variabel (auch basische AS)	Lys/ Arg	Leu
37	Asp	kleine AS	Gly
38	hydrophobe oder basische AS	Arg	Arg

stehen. Allerdings wird auch in einer Reihe von NAD-bindenden Proteinen an dieser Stelle eine basische Aminosäure beobachtet. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die eigentlich entscheidende Aminosäure in Position 37 zu finden ist (Jörnvall et al., 1995).

Durch den Austausch von Gly37 (NADP-abhängige R-ADH-Lb) gegen Asp konnte die Kosubstratspezifität geändert werden (NAD-abhängige R-ADH-Lb) (B. Riebel, persönliche Mitteilung).

Substratbindung Die Bindestelle des Substrates liegt in einer langen mit Lösemittel gefüllten Spalte, die durch Teile von βD , βE und βF ausgekleidet und durch die flexible Loopregion mit den Helices $\alpha FG1$ und $\alpha FG2$ zum Medium hin verschlossen wird. Trotz der hohen Diversität unter den SDR-Proteinen in diesem Bereich, befinden sich einige konservierte Sequenzabschnitte in der Substratbindungstasche (siehe Abbildung 4.34). Dazu zählen die Aminosäuren Ile92–Lys96, Met140–Leu152, Tyr155, Lys159 und Val185–Tyr189.

Die räumliche Anordnung des Substrates im aktiven Zentrum ist in Abbildung 4.32 veranschaulicht. Das Protein weist in diesem Bereich eine ausgeprägte hydrophobe Oberfläche auf, die den aromatischen Rest des Acetophenons – oder eine lange aliphatische Kette bei einem anderen Substrat – festhält.

Die vorliegenden Strukturdaten der R-ADH-Lb zeigen, dass auf Grund sterischer

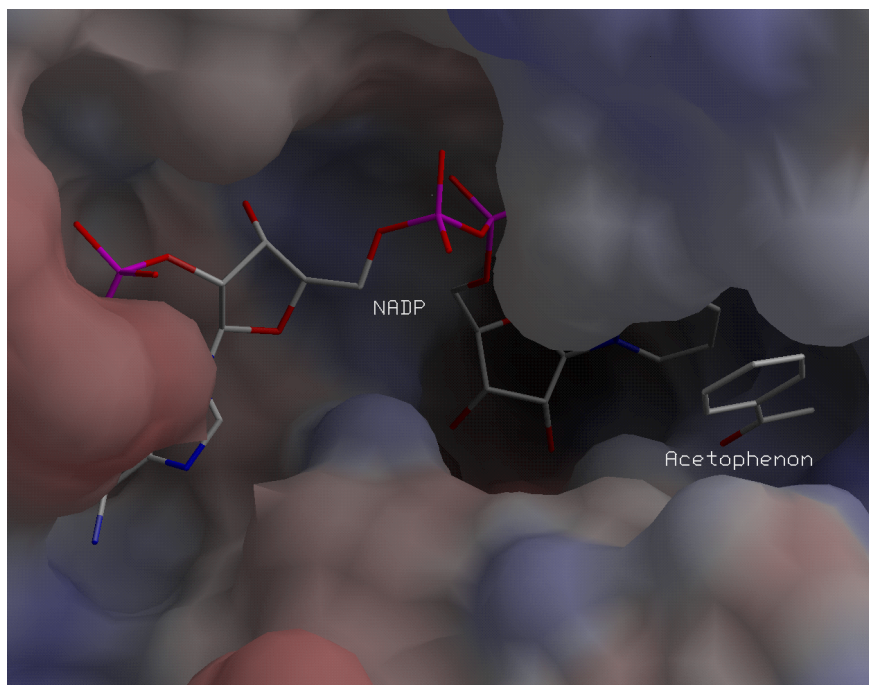


Abbildung 4.32: Oberfläche des aktiven Zentrums der R-ADH-Lb. Die Oberfläche ist elektrostatisch gefärbt. rot: positive Ladung, blau: negative Ladung. Das NADP und das Acetophenon sind als Stabmodell dargestellt. Die Abbildung wurde mit BRAGI erstellt.

Hinderung der zweite Rest des Substrates eine Methylgruppe sein muss, da sich die Seitenketten von Ile143 und Tyr189 in direkter räumlicher Nähe zur Methylgruppe des Acetophenons befinden. Der Benzolring des Acetophenons wird durch Atome der Seitenketten von Ala92, Tyr155, Leu194 und Met205 in der für die Katalyse notwendigen Position stabilisiert. Das Substrat kann folglich nur in einer Orientierung binden und die Reduktion verläuft streng R-stereospezifisch. Im Fall der Oxidation akzeptiert die R-ADH-Lb dementsprechend nur R-Alkohole.

Die oben genannten Aminosäurereste sind somit potentielle Kandidaten für Mutagenesestudien mit dem Ziel der Änderung oder Erweiterung des Substratspektrums der R-ADH-Lb.

4.1.10.6 Reaktionsmechanismus

Der im Folgenden diskutierte Reaktionsmechanismus beruht auf einem Reaktionsmodell von Tanaka et al. (1996a). Ausgehend von NADPH und einem Keton (z.B. Acetophenon) soll die Reduktion des Substrates zu einem sekundären R-Alkohol beschrieben werden.

Die Katalyse wird durch die Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr155 durch den Carbonylsauerstoff des Substrates eingeleitet. Der Übergangszustand wird durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken stabilisiert (siehe Abbildung 4.33).

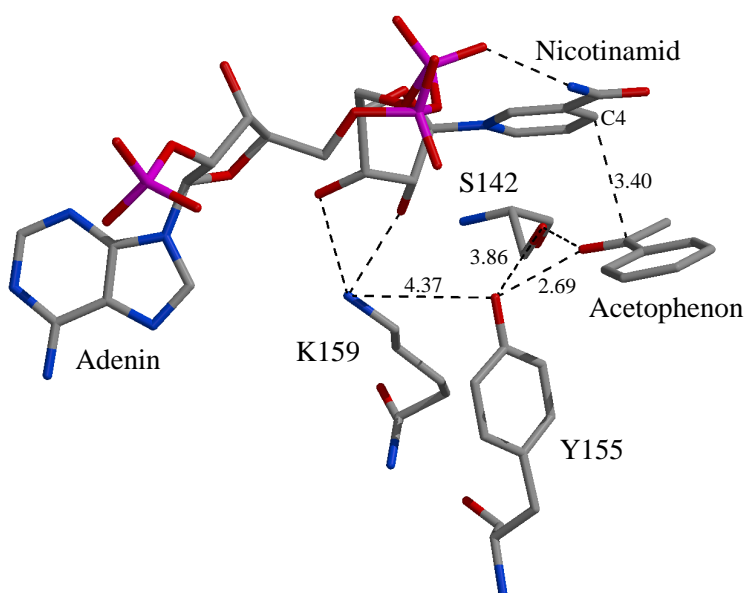


Abbildung 4.33: Aktives Zentrum der R-ADH-Lb. Gezeigt ist die katalytische Triade (Ser, Tyr, Lys), das Substrat Acetophenon und das Kosubstrat NADP. Alle Abstände zwischen den Atomen sind in Å angegeben. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

Eine besondere Rolle kommt dabei der Hydroxylgruppe von Ser142 zu, die sowohl die negative Ladung der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyr155 stabilisiert als auch das Substrat in der für den Hydridtransfer erforderlichen Position fixiert. Eine Interaktion zwischen der Aminogruppe von Lys159 und

der Hydroxylgruppe von Tyr155 scheint fraglich zu sein, da der Abstand für eine gerichtete Interaktion zu groß ist (Ghosh et al., 1994). Diesem Rest kommt wahrscheinlich eher die Aufgabe der Fixierung des Nicotinamid-Ribose-Teils des Kosubstrates während der Katalyse zu.

Im zweiten Schritt der Reaktion wird vom C4-Kohlenstoff des Nicotinamidrings das *pro-S*-Hydrid – von der *Si*- oder B-Seite des Nicotinamidrings – auf den Carbonylkohlenstoff des Substrates (in Abbildung 4.33 Acetophenon) transferiert und ein Proton aus dem Lösemittel auf die Hydroxylgruppe des Tyr155 übertragen. Diese *pro-S*-Stereospezifität ist charakteristisch für alle SDR-Proteine (Jörnvall et al., 1981) und korreliert mit der Gleichgewichtskonstante der Alkohol-Carbonyl-Redoxreaktion (Oppenheimer and Handlon, 1992). Leicht reduzierbare Carbonylverbindungen, wie α -Ketoaldehyde oder α -Ketosäuren, verwenden das *pro-R*-Proton, während schwer reduzierbare Carbonylverbindungen, wie β -Ketosäuren oder Ketone, das *pro-S*-Proton verwenden (Oppenheimer and Handlon, 1992). Diese, für einfache Substrate gültige Korrelation, liefert einen funktionellen Hinweis auf das biochemisch charakterisierte Substratspektrum der R-ADH-Lb (Riebel, 1996).

Bisher konnte nicht geklärt werden, ob die Reaktion – wie beschrieben – in zwei Schritten abläuft, oder die Abstraktion des Protons durch den Carbonylkohlenstoff des Substrates und der Hydridtransfer simultan ablaufen. Durch die Strukturdaten kann keine der beiden Alternativen ausgeschlossen werden.

Für den Fall der Oxidation läuft die Reaktion in umgekehrter Reihenfolge der oben beschriebenen Schritte ab.

Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass das pH-Optimum für die Reduktion etwa bei pH 6.5 und für die Oxidation etwa bei pH 8.0 liegt (Riebel, 1996). Der pK_S -Wert einer phenolischen Hydroxylgruppe eines Tyr liegt bei 10.1 (Dawson et al., 1969). Dies würde eine nahezu vollständige Protonierung der phenolischen Hydroxylgruppe am pH-Optimum der Oxidation bedeuten. Möglicherweise kann die Aminogruppe der Seitenkette von Lys159 einen Einfluss auf den Protonierungsgrad der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr155 ausüben, also den pK_S -Wert senken.

Desweiteren befindet sich die hoch konservierte Aminosäure Asn113 in der Nähe des aktiven Zentrums. Die Seitenkette ist auf der vom aktiven Zentrum abge-

wandten Seite von Tyr155 und Lys159 lokalisiert. Ihr Einfluss auf die Katalyse ist unklar, da der minimale Abstand zwischen dem Amidstickstoff und der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyr155 mit 5.52 Å bzw. der Aminogruppe des Lys159 mit 4.63 Å für eine starke Interaktion zu groß ist.

Tyr155 und Lys159 liegen auf der „Innenseite“ der Helix α_F , die die Assoziation der Monomere der R-ADH-Lb über die Q-Achse vermitteln (siehe Seite 116). Über diesen Kontakt werden die strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum bei der Substratbindung auf das korrespondierende Monomer übertragen (Ghosh et al., 1994). Auf diese Weise können die Substratbindungseigenschaften sowie die Aktivität des zweiten Monomers beeinflusst (*induced fit*) und ein kooperativer Effekt auf die Katalyse erzielt werden.

4.1.10.7 Strukturvergleich mit anderen SDR-Proteinen

Proteine zeigen auf der Ebene der Tertiärstruktur in vielen Bereichen eine hohe Homologie, obwohl die divergente Evolution auf der Sequenzebene bereits viele Ähnlichkeiten entfernt hat. Hier zeigt sich, dass die Tertiärstruktur in der Regel die höher konserviertere Ebene ist als die Aminosäuresequenz. Dies trifft ganz allgemein auf die NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen (neben SDR- auch MDR- und LDR-Proteine) zu, die in der *Rossmann-Faltung* (Rossmann et al., 1975) ein gemeinsames Nucleotidbindungsmotiv bei geringer Sequenzidentität haben. In anderen Bereichen der Struktur weisen die SDR- mit den MDR- und LDR-Proteinen so gut wie keine strukturellen Ähnlichkeiten auf und gehören zu verschiedenen Faltungsklassen (Ghosh et al., 1991). Das Vorhandensein dieses gemeinsamen Faltungsmotivs bei evolutiv derartig verschiedenen Proteinen ist ein Beispiel für die konvergente Evolution von Proteinfamilien.

Die Gruppe der SDR-Proteine, die etwa 50 verschiedene Enzyme umfasst, erstreckt sich über mehrere EC-Klassen, den Oxidoreduktasen (EC 1.), Lyasen (EC 4.) und Isomerasen (EC 5.) (Jörnvall et al., 1995). Ihre Sequenzidentitäten schwanken zwischen 12 und 58 %, im Durchschnitt beträgt die Identität 25 %, was einen gemeinsamen Ursprung mit evolutiver Divergenz andeutet. In Tabelle 4.15 sind die Homologien auf Primär- und Tertiärstrukturebene der verglichenen SDR-Proteinstrukturen zusammengefasst.

Abbildung 4.34 zeigt das multiple Sequenzalignment strukturell aufgeklärter SDR-Proteine und die jeweiligen Sekundärstrukturbereiche. Alle alignierten Strukturen weisen kleine RMS-Werte sowie eine große Anzahl strukturalignierter Aminosäuren auf und zeigen identische Muster von Sekundärstrukturen (siehe Seite 110ff). Dies deutet auf die Zugehörigkeit zu einer gemeinsamen Faltungsfamilie (SCOP-Nomenklatur, Murzin et al. (1995)) hin. Lediglich in einigen Regionen außerhalb der konservierten Sekundärstrukturbereiche finden sich größere Unterschiede, die somit keinen Einfluss auf die globale Faltung haben. In Abbildung 4.35 wird dies an Hand der Superposition einiger bekannter SDR-Proteine veranschaulicht.

Die markanteste strukturelle Variabilität zeigen die alignierten SDR-Proteinstrukturen im C-terminalen Bereich. Dazu gehören die flexible Substratbindungsschleife (oberer Bereich in Abbildung 4.35) und der C-Terminus (oben rechts in Abbildung 4.35), der in einigen SDR-Proteinen weit in das Innere einer symmetrieäquivalenten Untereinheit hineinragt (Ghosh et al., 1994). Dieser Bereich ist für die Substratbindung und die Katalyse zuständig und weist auch in der Primärstruktur nur geringe Übereinstimmungen auf (siehe Abbildung 4.34). Dies erklärt das weite Substratspektrum der SDR-Proteine, die u.a. Methanol, Glucose, Steroide oder Prostaglandine umsetzen können.

Streng konserviert ist die katalytische Triade mit Ser142, Tyr155 und Lys159, wobei die beiden letztgenannten Reste das Motiv YXXXX bilden. Diese Konfiguration im aktiven Zentrum lässt für die SDR-Proteine einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus vermuten (siehe Seite 131ff).

Der N-terminale Bereich (mittlerer Bereich in Abbildung 4.35) mit der Glyreichen NAD(P)-Bindestelle ist sowohl in der Primär- als auch in der Tertiärstruktur stärker konserviert. Hier zeigen sich auch Homologien zu anderen Nucleotidbindenden Proteinen, wie bereits diskutiert wurde.

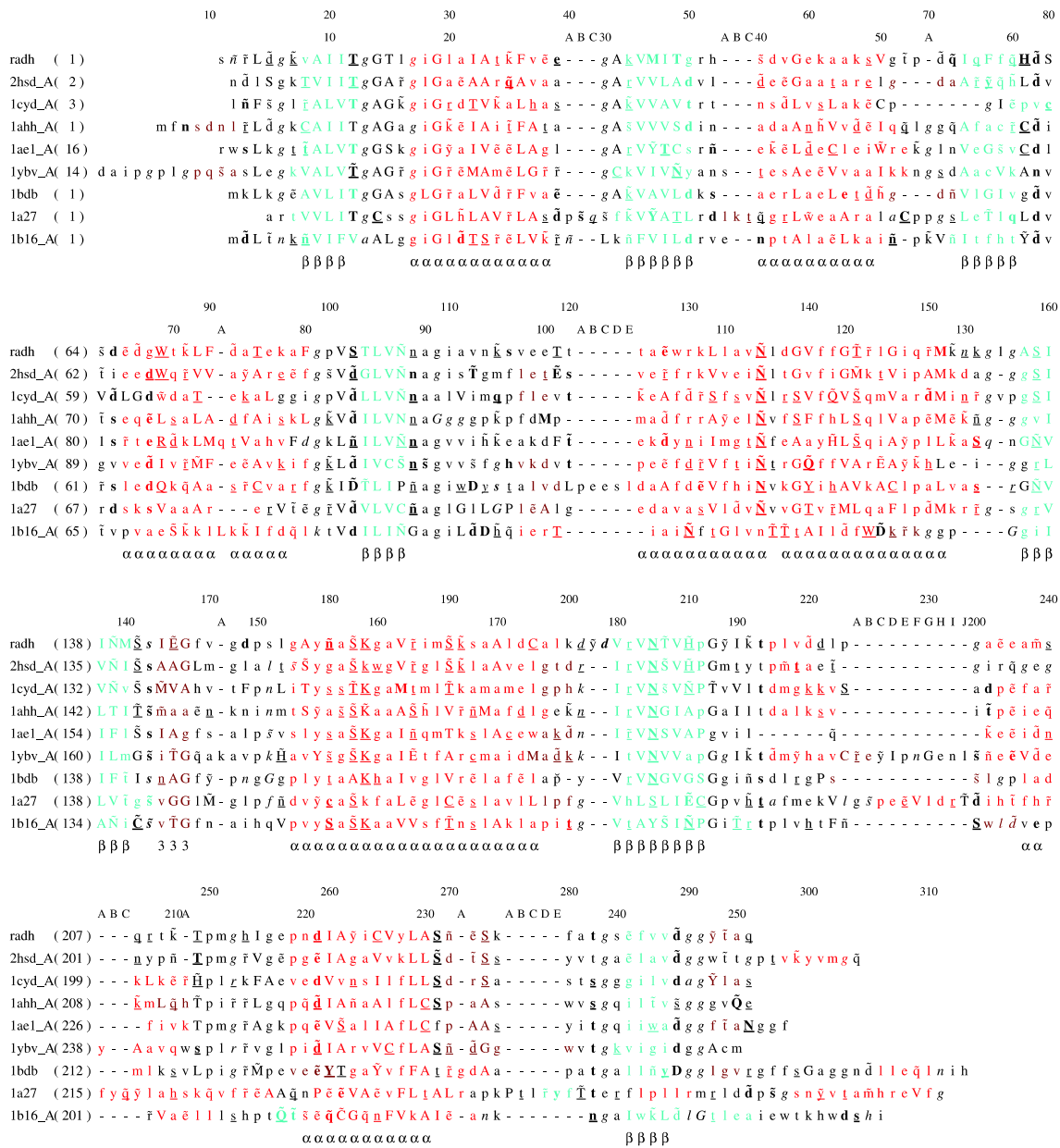


Abbildung 4.34: Multiples Sequenzalignment bekannter SDR-Strukturen, erstellt mit CLUSTALW und JOY. Unter den Sequenzen sind die mit dem Programm DSSP nach der Methode von Kabsch and Sander (1983) berechneten Sekundärstrukturen gezeigt. Großbuchstaben: solvensunzugänglich, Kleinbuchstaben: solvenszugänglich, *kursiv*: positiver ϕ -Winkel, Breve (z.B. \check{p}): *cis*-Peptid, Tilde: Wasserstoffbrückenbindung zu einer anderen Seitenkette, **fett**: Wasserstoffbrückenbindung zu einem Hauptkettenamid, unterstrichen: Wasserstoffbrückenbindung zu einem Hauptketten-carbonyl, rot: α -Helix, grün: β -Faltblatt, braun: 3_{10} -Helix. 1b16: α -ADH (Drosophila), 1a27: 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase, 1bdb: *cis*-Biphenyl-2,3-Dihydrodiol-2,3-Dehydrogenase, 1lybv: β -Trihydroxynaphtalenreduktase, radh: R-ADH-Lb, 2hsd: 3 α ,20 β -Hydroxysteroiddehydrogenase, 1ahh: 7 α -Hydroxysteroiddehydrogenase, 1ae1: Troponinreduktase-I, 1cyd: Carbonylreduktase. Die Sequenzen sind nach ihrer relativen Ähnlichkeit geclustert.

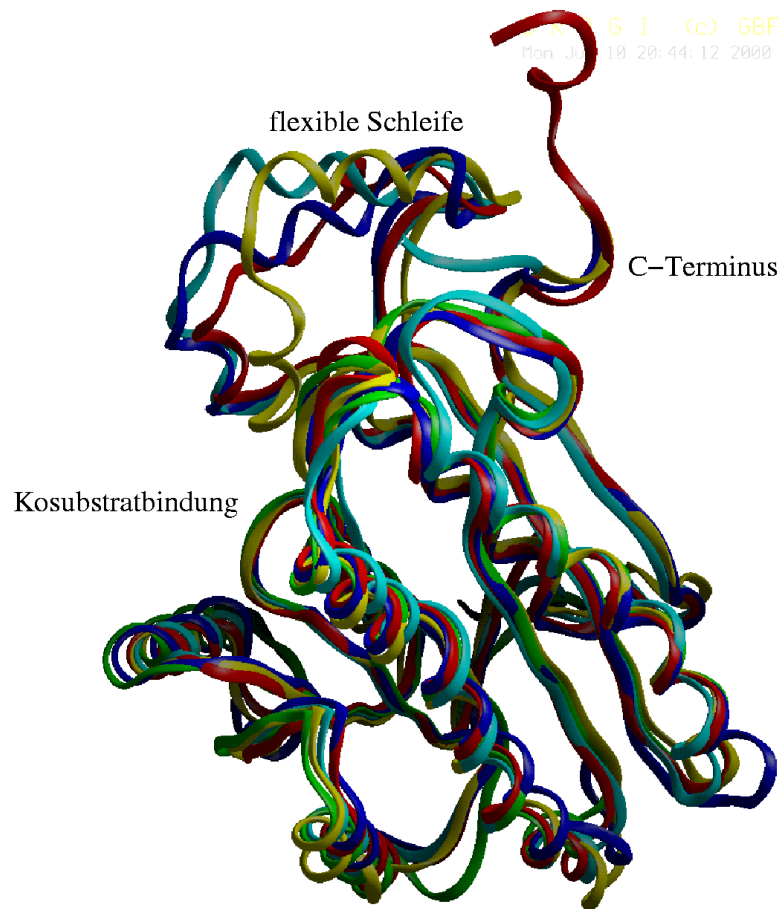


Abbildung 4.35: Superposition bekannter SDR-Strukturen. Gezeigt ist das Proteinrückgrat bekannter SDR-Strukturen. blau: R-ADH-Lb, rot: $3\alpha,20\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (2hsd), grün: Troponinreduktase-I (1ae1), gelb: Carbonylreduktase (1cyd), hellblau: 7α -Hydroxysteroiddehydrogenase (1ahh). Zum Erstellen des Strukturalignments und der Abbildung wurde BRAGI verwendet.

4.1.11 Ausblick

Die vorliegenden 3D-Strukturdaten sind von hoher Qualität und können für weitere detailliertere Analysen bezüglich der stereochemischen Daten von Proteinstrukturen verwendet werden. Die Anzahl makromolekularer Strukturen dieser

Größenordnung mit einer Auflösung besser als 1 Å ist bisher noch begrenzt, um allgemeingültige Aussagen treffen zu können (siehe Abschnitt 2.2.3).

Wünschenswert wäre eine eingehendere Untersuchung der Substratbindungsstelle, des aktiven Zentrums und der Substratbindungsstelle. Hierfür ist die erneute Kristallisation eines ternären Komplexes notwendig, in dem das Kosubstrat und das Substrat bzw. der Inhibitor effektiver gebunden sind. Dadurch könnten zusätzliche Informationen, wie z.B. eine genauere Bestimmung der Distanzen im aktiven Zentrum, erzielt werden, um schließlich den postulierten Reaktionsmechanismus zu überprüfen. Zusätzlich sind weitere Mutagenesestudien notwendig, um beispielsweise die Rolle von Asn89 oder Asn113 für die Katalyse zu klären. Schließlich sollten einige Mutanten für eine umfassende Untersuchung der strukturellen Auswirkungen der Aminosäureaustausche kristallisiert werden.

4.2 Die D-AO-Tv

4.2.1 Ausgangsbedingungen

Die strukturelle Untersuchung der D-AO-Tv wurde in Kooperation mit Frau Martina Müller (Arbeitsgruppe von Lutz Fischer an der TU Braunschweig) durchgeführt. Dabei fiel der Kooperationspartnerin die Aufgabe der Fermentation, Aufreinigung und biochemischen Charakterisierung des Proteins zu.

Die oben aufgeführten Arbeitsschritte sind in der Dissertaion von Frau Müller zusammengefasst (Müller, 2000).

4.2.2 Aufreinigung

Vorgereinigte Enzymchargen wurden von der Kooperationspartnerin zur Verfügung gestellt. Durch ein SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung konnte die Reinheit auf ca. 80–90 % abgeschätzt werden. Das hier verwendete Protokoll der Aufreinigung umfasste einen in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Reinigungsschritt mit einer Anionenaustauschersäule. Der verwendete Anreicherungsschritt erbrachte eine für die Kristallisation ausreichende Reinheit des Enzyms. In Abbildung 4.36 sind die Fraktionen der D-AO-Tv vor und nach dem Chromatographieschritt im SDS-PAGE dargestellt.

Das SDS-PAGE zeigt, dass nach dem Anreicherungsschritt die D-AO-Tv bei apparenten 40 kDa eine Reinheit von ca. 95 % aufweist, was für eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins ausreichend war.

Anschließend wurden die aufgereinigten Proteinproben vereinigt, aufkonzentriert und bei 4°C gelagert. Die Proteinproben ließen sich dabei auf eine Konzentration von maximal 7 mg/ml anreichern. Die mittlere spezifische Aktivität der verschiedenen verwendeten Proteinchargen betrug (22.2 ± 3.3) U/mg. Das Protein verlor in fünf Monaten ca. 50 % seiner Aktivität, was auf die Anwesenheit einer Protease zurückzuführen war, die in den aufgereinigten Proteinfractionen nachgewiesen werden konnte. Durch Zugabe eines universellen Proteaseinhibitorcocktails (3 mM EDTA, 35 µg/ml PMSF, 0.7 µg/ml Pepstatin A und 0.5 µg/ml Leupeptin, Bollag et al. (1996)) zum Standardpuffer (siehe Abschnitt 3.2.2) konnte die Langzeitstabilität verbessert werden.

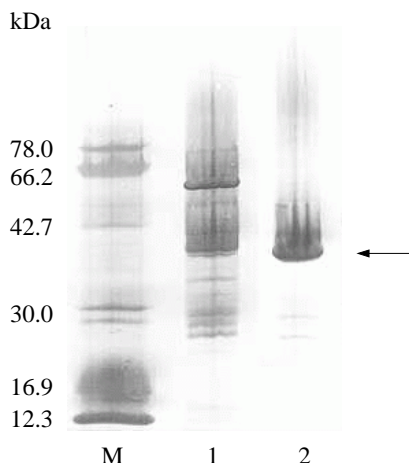


Abbildung 4.36: SDS-PAGE der D-AO-Tv vor (1) und nach (2) der Anionenaustauscherchromatographie. Pfeil: D-AO-Tv. M: Marker.

4.2.3 Analytik

4.2.3.1 Massenspektren

Das Massenspektrum der D-AO-Tv diente zur Reinheitskontrolle der Proben für die Kristallisation und zur Bestimmung des Molekulargewichts des Proteins. Dies war deshalb notwendig, weil zu Beginn des Projektes die Sequenz des Proteins noch nicht bekannt war und somit keine verlässlichen Daten über das Molekulargewicht der D-AO-Tv vorlagen. Abbildung 4.37 zeigt das MALDI-MS der D-AO-Tv.

Durch das MALDI-Experiment konnte die etwa 95 %-ige Reinheit des Proteins aus der elektrophoretischen Analyse (siehe Abschnitt 4.2.2) bestätigt werden. Lediglich die Verunreinigung bei ca. 28 kDa konnte auch hier detektiert werden. Die Molekulargewichtsbestimmung zeigt, dass der Peak des einfach geladenen Monomers bei 40.1 kDa dem Holoenzym der D-AO-Tv mit gebundenem FAD (Apoenzym 39.2 kDa, FAD 0.86 kDa) entspricht. Das genaue Molekulargewicht der D-AO-Tv konnte durch Klonierung und Sequenzierung der cDNA des D-AO-Tv-Gens bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Die Schultern am Peak des einfach geladenen Mutterions entsprechen dem Apoenzym der D-AO-Tv (ca. 39.2 kDa) bzw. dem Sinapinsäureaddukt des Holoenzym (ca. 40.5 kDa).

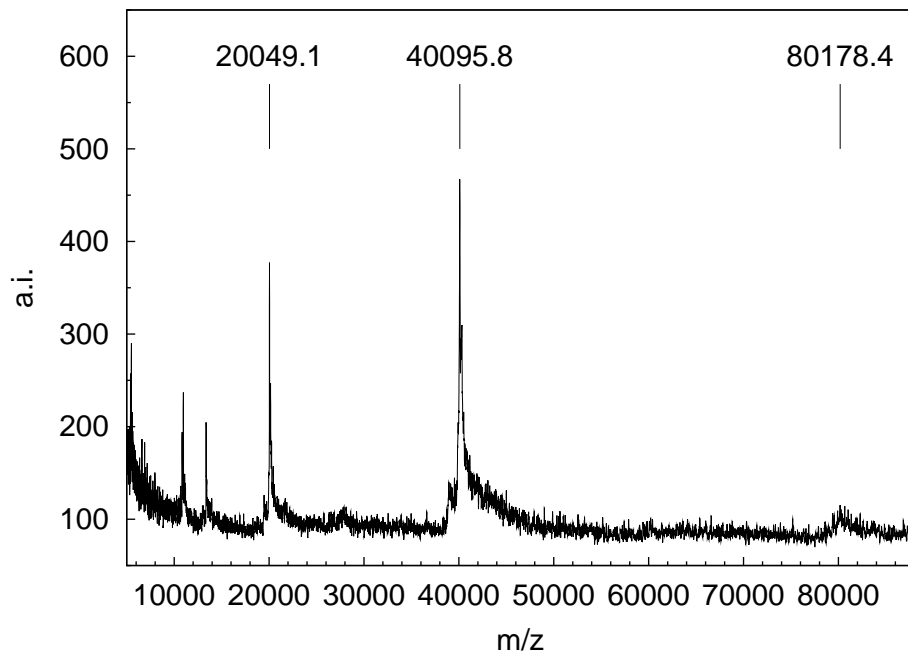


Abbildung 4.37: MALDI-MS der D-AO-Tv. *Cut off:* 1000 Da. Spektrenakkumulation: 60. Externe Kalibrierung gegen Protein A. Der Peak bei 80.2 kDa ist auf das einfach geladene Dimer der D-AO-Tv zurückzuführen, der Peak bei 20.0 kDa stammt vom zweifach geladenen Monomer und der Peak bei ca. 13.5 kDa entspricht dem dreifach geladenen Monomer des Proteins.

Während der Ionisation kommt es nur zu einer geringen Abspaltung von FAD vom Enzym. Das Verhältnis der Peaks von Apo- und Holoenzym spiegelt diese Tatsache wider und ist auf die feste, jedoch nicht kovalente Bindung des Kosubstrates FAD an das Enzym (Müller, 2000) zurückzuführen.

4.2.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Die Proteinkonzentrationen bei den Experimenten wurden so gewählt, dass sie innerhalb des empfohlenen Messbereiches für das Gerät lagen und die Anzahl der gestreuten Photonen pro Sekunde (*Count Rate*) verwertbare Ergebnisse lieferte. Dabei erwies sich eine Konzentration von 0.1 mg/ml als sinnvoll. In Tabelle 4.16 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 4.16: Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuexperimente mit der D-AO-Tv. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus insgesamt 20 *Scans*. Die Molekulargewichtsabschätzung erfolgte mit dem Modell der „Vol. Shape Hydration 147–370 kDa“. Der Modus der Auswertung war bimodal.

hydrodynamischer Radius	4.9 nm und 0.2 nm
Polydispersitätsindex	1.1 nm
berechnetes Molekulargewicht	171 kDa und 11.6 kDa
<i>Baseline</i>	1.002
<i>SOS-Error</i>	6.819
prozentuale Anteile der Streuung	96.5 % und 3.2 %

Das berechnete Molekulargewicht der D-AO-Tv entspricht in etwa der Masse eines Tetramers (4×40 kDa) bzw. von zwei Dimeren, die die biologischen Einheiten der D-AO-Tv darstellen. Der Polydispersitätsindex von 1.1 nm zeigt eine recht große Verteilung des Molekulargewichtes in der Lösung an, was bedeutet, dass der Aggregationsgrad der Probe nicht einheitlich ist. Offenbar hatte diese unspezifische Aggregation bei der Kristallisation keinen Einfluss, da eine Vielzahl der Kristallisationsexperimente erfolgreich verliefen (siehe Abschnitt 4.2.4). Dennoch kann die Aggregation zu einer relativ schwierigen Kristallisation und weniger gut-gewachsenen Kristallen mit schlechten Streueigenschaften führen. Für das kleinere Molekül ergibt sich rechnerisch ein Molekulargewicht von 11.6 kDa (siehe Tabelle 4.16). Wie in Abschnitt 4.2.2 erwähnt, wurde in der Proteinlösung eine Proteaseaktivität nachgewiesen. Es könnte sich bei diesem Fragment also um ein Fragment der D-AO-Tv handeln. Die Kristallisation wurde dadurch nicht beeinflusst, da die Kristallisationslösung mit Proteaseinhibitoren versetzt wurde (siehe Abschnitt 4.2.2).

4.2.3.3 CD-Spektren

Das CD-Spektrum der D-AO-Tv ist in Abbildung 4.38 zu sehen.

Die beiden Spektren weisen deutliche Unterschiede sowohl in Bezug auf die Intensität als auch im Kurvenverlauf auf. Dies bedeutet, dass die D-AO-Tv nach

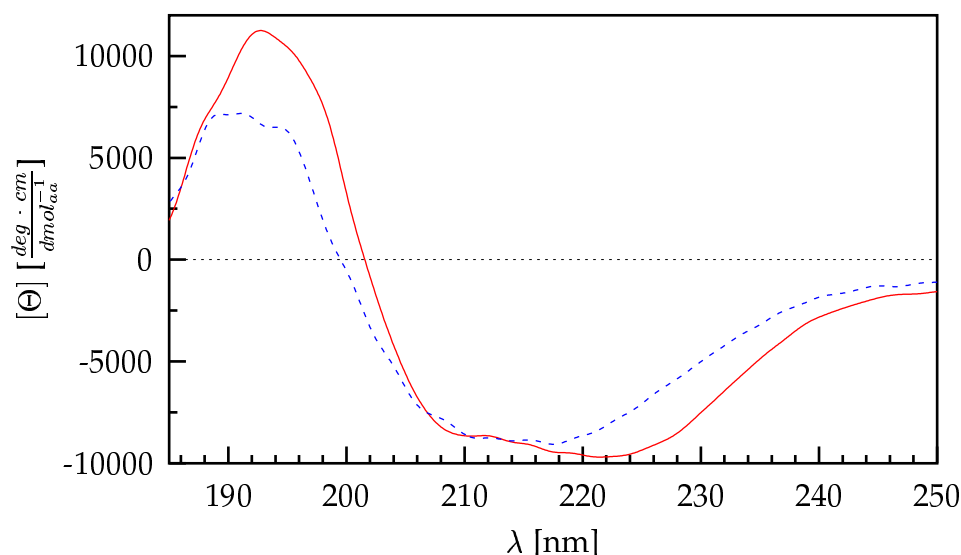


Abbildung 4.38: CD-Spektrum der D-AO-Tv. Die rote durchgezogene Linie zeigt das Spektrum bei 20°C ohne vorheriges Aufheizen und die blaue gepunktete Linie das Spektrum bei 20°C nach vorhergehenden Aufheizen der Probe auf 90°C.

dem Aufheizen der Probe auf 90°C und Abkühlen auf 20°C in einem anderen Faltungszustand vorliegt bzw. gar nicht mehr zurückgefaltet wurde. Möglicherweise konnte beim Abkühlen das Kosubstrat FAD nicht mehr gebunden werden. Da FAD im gefalteten Zustand im Inneren des Proteins eingeschlossen ist (siehe Abbildung 4.46), trägt es somit offenbar entscheidend zur Faltung des Proteins bei.

Da von der D-AO-Tv die Sequenz bekannt ist, wurden – neben der Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus den CD-Spektren – auch Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt, die auf der Abfolge der Aminosäuren beruhen. Desweiteren wurden die aus dem gemodellten 3D-Struktur der D-AO-Tv bestimmten Sekundärstrukturanteile zum Vergleich herangezogen. Die rechnerische Auswertung der Spektren mit den Programmen CONTIN, K2D und SELCON ergaben die in Tabelle 4.17 zusammengefassten Sekundärstrukturanteile.

Die oben gezeigte Tabelle zeigt für die D-AO-Tv einen signifikanten Anteil an α -Helices und β -Faltblättern, der laut Strukturmodell jeweils bei etwa 25 % liegt.

Tabelle 4.17: Mittels CD-Spektroskopie ermittelte Sekundärstrukturelemente der D-AO-Tv. Alle Angaben in %. CONTIN (Referenzdatensatz): 16 native Proteine. SELCON (Referenzdatensatz): nach (Johnson, 1990). Die Vorhersage wurde mit dem Programm PREDATOR durchgeführt. Die Sekundärstrukturanteile der gemodellten 3D-Struktur wurden mit dem Programm DSSP ermittelt.

	Contin	K2D	SELCON	Vorhersage	Strukturmodell
α -Helix	35	32	26	19	28
β -Faltblatt	21	12	24	26	21
Rest	43	57	50	55	51

Die mit CONTIN und K2D ermittelten Sekundärstrukturanteile aus den CD-Spektren sind für die α -helikalen Anteile eher zu hoch und für die mit K2D ermittelten β -Faltblattanteile eher zu niedrig. Hingegen weisen die mit SELCON ermittelten Daten und die durch CONTIN ermittelten β -Faltblattanteile eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Strukturmodell auf. Obwohl die Bestimmung der Proteinkonzentration sicher nur ungenau war, konnten die Sekundärstrukturgehalte recht genau bestimmt werden.

Die sequenzbasierte Vorhersage liefert ein ähnliches Bild wie die CD-Spektren, jedoch mit etwas zu geringen Anteilen an α -Helices und etwas zu hohen Anteilen an β -Faltblättern.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei der Referenz nur um ein Modell der 3D-Struktur handelt und sich in der wirklichen Struktur Abweichungen von den hier verwendeten Sekundärstrukturanteilen ergeben.

Aus dem Habitus der Spektren kann man die Proteine grob in Faltungsklassen einteilen (Greenfield, 1996). Dabei können $\alpha+\beta$ -Proteine und α/β -Proteine durch das relative Verhältnis der Intensitäten der Banden bei 222 und 208 nm unterschieden werden. In α/β -Proteinen ist die Signal bei 222 nm größer als bei 208 nm. Demnach gehört die D-AO-Tv der Klasse der α/β -Proteine an, was durch das Strukturmodell der D-AO-Tv gestützt wird (siehe Abbildung 4.46).

Die Schmelzkurve der D-AO-Tv (siehe Abbildung 4.39) wurde bei 222 nm ge-

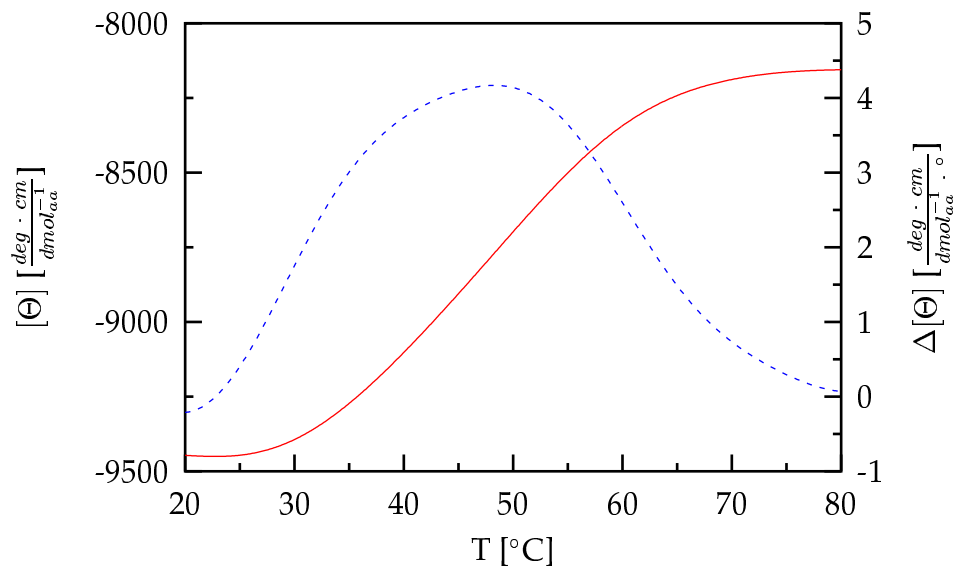


Abbildung 4.39: Schmelzkurve der D-AO-Tv bei 222 nm. Die rote durchgezogene Linie zeigt die Schmelzkurve der R-ADH-Lb und die blau gepunktete Linie die erste Ableitung dieser Kurve nach der Temperatur.

messen, da das CD-Spektrum (siehe Abbildung 4.38) bei dieser Wellenlänge das stärkste Signal aufweist und dabei der α -helikale Anteil spektrenbestimmend ist. Daher ist beim Aufheizen des Proteins bei dieser Wellenlänge auch die deutlichste Veränderung im Spektrum zu erwarten.

Der Schmelzpunkt ist als der Wendepunkt in der Schmelzkurve definiert. Dieser liegt bei ca. 49°C (blaue gepunktete Linie in Abbildung 4.39). Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit dem gemessenen Temperaturoptimum der Aktivität von 65°C (Müller, 2000). Möglicherweise liegt dieser Gegensatz in der Natur der Messmethode. Bei der Schmelzpunktbestimmung durch CD-Spektroskopie wird nicht direkt die Faltungsenthalpie eines Proteins gemessen, sondern die Verschiebung bzw. die Änderung der Interaktionen zwischen den Sekundärstrukturelementen mit der Temperatur. Folglich gibt der Schmelzpunkt die Temperatur des „Aufweichens“ der Quartärstruktur wider – d.h. das Homodimer zerfällt in zwei Monomere, die immer noch aktiv sind – und nicht die vollständige Entfaltung des Proteins.

4.2.4 Kristallisation

Von der D-AO-Tv waren keine Kristallisationsbedingungen bekannt. Zu Beginn wurden die faktoriellen Tests nach (Jancarik and Kim, 1991) (Crystal Screen, Fa. Hampton Research) und nach (Cudney et al., 1994) (Crystal Screen 2, Fa. Hampton Research) verwendet. Desweiteren wurden eine Vielzahl systematischer Ansätze mit für Proteine häufig verwendeten Fällungsmitteln, wie Ammoniumsulfat, Natriumchlorid, PEG 400, PEG 6000 sowie PEG 6000 mit LiCl, durchgeführt (McPherson, 1990). Die systematischen Ansätze dienten in erster Linie der Bestimmung der Sättigungskonzentration der D-AO-Tv in verschiedenen Fällungsmitteln in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Fällungsmittelkonzentration. Die allgemeinen Kristallisationsbedingungen entsprachen den in Abschnitt 3.4.3 dargestellten.

Bei allen durchgeführten Ansätzen wurde dem Tropfen das kompetitiv inhibierende Substratanalogon α -D,L-Hydroxyoktansäure (Müller, 2000) zugesetzt, da ein besonderes Interesse bei der Strukturlösung der räumlichen Anordnung im aktiven Zentrum gilt. Die Zugabe des Kosubstrates FAD war hingegen nicht erforderlich, da ein FAD-Molekül pro Monomer zwar nicht kovalent, jedoch fest an die D-AO-Tv gebunden ist.

Mit einer ganzen Reihe der oben genannten Fällungsmittel konnte reproduzierbares Kristallwachstum beobachtet werden. Die aus diesen Bedingungen optimierten Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 4.18 zusammengefasst.

Die größten und am besten geformten Kristalle konnten mit Ammoniumphosphat als Fällungsmittel gezüchtet werden. Die optimale Kristallisationsbedingung enthielt 2.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 % (v/v) Glycerin, 0.1 M Tris/HCl pH 8.2 und 1 μM α -D,L-Hydroxyoktansäure (siehe Abbildung 4.40). Die erhaltenen Kristalle waren von bipyramidaler Gestalt und extrem fragil. Sie ließen sich mit IZIT (Fa. Hampton Research) sehr gut anfärben (siehe Abbildung 4.41), was auf einen hohen Lösemittelanteil schließen läßt. Es zeigte sich, dass die Kristallisation nicht von der Wahl der Methode (sitzender oder hängender Tropfen) abhing, jedoch von der Größe der Tropfen. Mit größeren Tropfen konnten auch größere Kristalle gezüchtet werden.

Tabelle 4.18: Optimierte Kristallisationsansätze der D-AO-Tv. Die allgemeinen Kristallisationsbedingungen entsprechen den in Abschnitt 3.4.3 dargestellten. Die Kristallisationsergebnisse haben folgende bei der Dokumentation dieser Ergebnisse üblichen Kennzahlen: 2: diffuses Präzipitat; 5: Nadeln; 6: Plättchen; 7: Einkristalle < 0.2 mm; 8: Einkristalle > 0.2 mm.

	Fällungsmittel	Puffer	pH	Ergebnis
1	2.1–2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 % Glycerin	0.1 M Tris/HCl	7.3–8.8	5, 7, 8
2	1.75–2.25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	6.0–8.0	7, 8
3	32.5 % PEG 400, 0.1–0.3 M CaCl_2	0.1 M Imidazol/HCl	6.8–7.5	2+6, 7
4	17–21 % PEG 8000, 0.2 M $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	0.1 M Tris/HCl	7.0–8.0	2+7

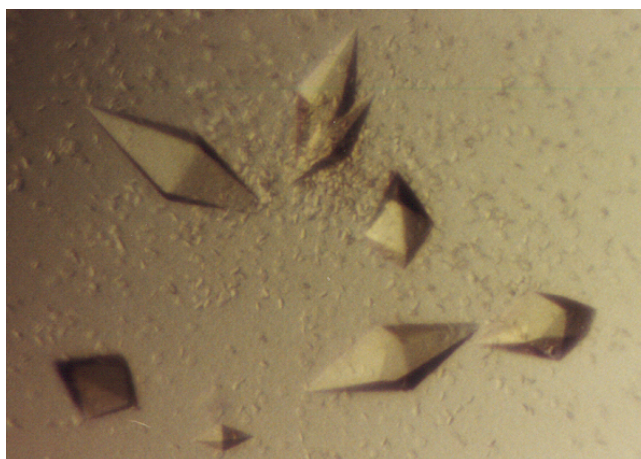


Abbildung 4.40: Primitiv tetragonale Kristalle der D-AO-Tv (Raumgruppe $P4_12_12$ oder $P4_32_12$), gewachsen in 2.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 % (v/v) Glycerin, 0.1 M Tris/HCl pH 8.2 und 1 μM α -D,L-Hydroxyoktansäure. Größe: ca. $0.2 \times 0.2 \times 0.6$ mm.

Auf Grund der geringen Stabilität im Röntgenstrahl und der geringen Streukraft der Kristalle (siehe Abschnitt 4.2.5) wurde nach einer geeigneten Cryobedingung

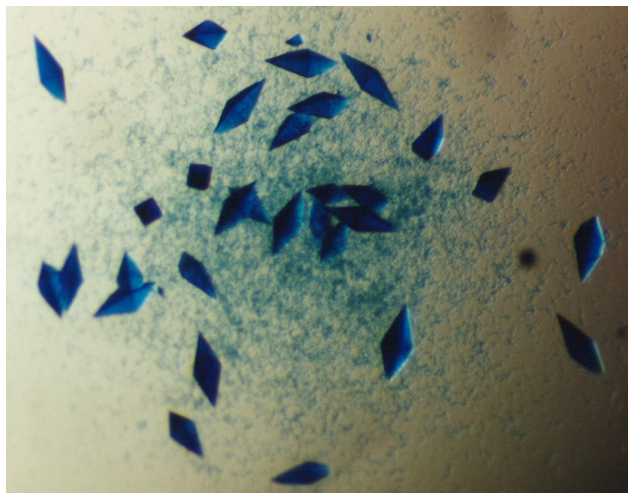


Abbildung 4.41: Primitiv tetragonale Kristalle der D-AO-Tv (Raumgruppe $P4_12_12$ oder $P4_32_12$), gewachsen in 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.1 M Tris/HCl pH 7.9 und 1 μM α -D,L-Hydroxyoktansäure. Größe: ca. $0.15 \times 0.15 \times 0.4$ mm. Die Kristalle wurden mit IZIT (Fa. Hampton Research) angefärbt.

gesucht. Diese sollte starke Strahlenschäden an den extrem fragilen Kristallen vermeiden und eine Vermessung der Kristalle mit Synchrotronstrahlung zur Verbesserung der maximalen Auflösung ermöglichen.

Da die optimale Kristallisationsbedingung kein Fällungsmittel enthielt, das als Frostschutzmittel geeignet war (Bedingung 1, Tabelle 4.18), musste ein Teil des Wassers in der Mutterlauge durch Glycerin ersetzt werden. Als optimaler Cryopuffer erwies sich folgende Lösung: 1.85 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 40 μ FAD, 1.15 mM α -D,L-Hydroxyoktansäure, 20 % Glycerin und 20 mM Tris/HCl pH 8.0. Für den Austausch der Mutterlauge im Kristall wurden die Kristalle unmittelbar vor der Röntgenmessung mit einem Cryoloop aus dem Kristallisationsansatz entnommen und für einige Sekunden (3-8 sec) in den Cryopuffer eingelegt. Anschließend wurden die Kristalle im Stickstoffstrahl (100 K) eingefroren und vermessen.

4.2.5 Röntgendiffraktometrie

Die Kristalle der D-AO-Tv erwiesen sich als äußerst instabil im Röntgenstrahl. Bei 4°C unter Verwendung von Cu K α -Strahlung (institutsinterner Messplatz: Nonius Drehanode und Mac Science Bildspeicherplatte) ließ die Streuintensität schon nach den ersten Beugungsaufnahmen stark nach und nach einer Strahlzeit von ca. 20 h streuten die Kristalle gar nicht mehr. Die maximale Auflösung der Daten lag bei 5 Å (Daten nicht gezeigt). Die Daten ließen sich mit DENZO indizieren und integrieren:

Kristallsystem	primitiv tetragonal (P ₄ ₁ 2 ₁ 2 oder P ₄ ₃ 2 ₁ 2)
Gitterkonstanten	a = b = 103.3 Å, c = 319.3 Å
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Nach der Skalierung mit SCALEPACK betrug die Vollständigkeit des Datensatzes 70.1 % mit einem R_{sym} -Wert von 27.7 %.

Zur Sammlung eines vollständigen und besser aufgelösten Datensatzes der D-AO-Tv wurden einige Kristalle mit Synchrotronstrahlung unter Stickstoffkühlung (100 K) getestet. Für die Messung eines kompletten Datensatzes wurde der Kristall mit dem größten Streuvermögen ausgewählt (siehe Abbildung 4.40), der für die Sammlung eines vollständigen Datensatzes ausreichte. Eine typische Beugungsaufnahme ist in Abbildung 4.42 gezeigt.

Der Datensatz wurde mit dem Programm DENZO indiziert und integriert. Die Skalierung erfolgte mit SCALEPACK, wobei die überladenen Reflexe ignoriert wurden.

Es wurden folgende Gitterparameter ermittelt:

Kristallsystem	primitiv tetragonal (P ₄ ₁ 2 ₁ 2 oder P ₄ ₃ 2 ₁ 2)
Gitterkonstanten	a = b = 97.90 Å, c = 318.82 Å
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

In Tabelle 4.19 sind die charakteristischen Daten des Synchrotondatensatzes der D-AO-Tv zusammengefaßt.

Die Qualität der hochaufgelösten Daten ist nicht sehr gut, was an dem niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis und den zunehmenden Strahlenschäden im Kristall

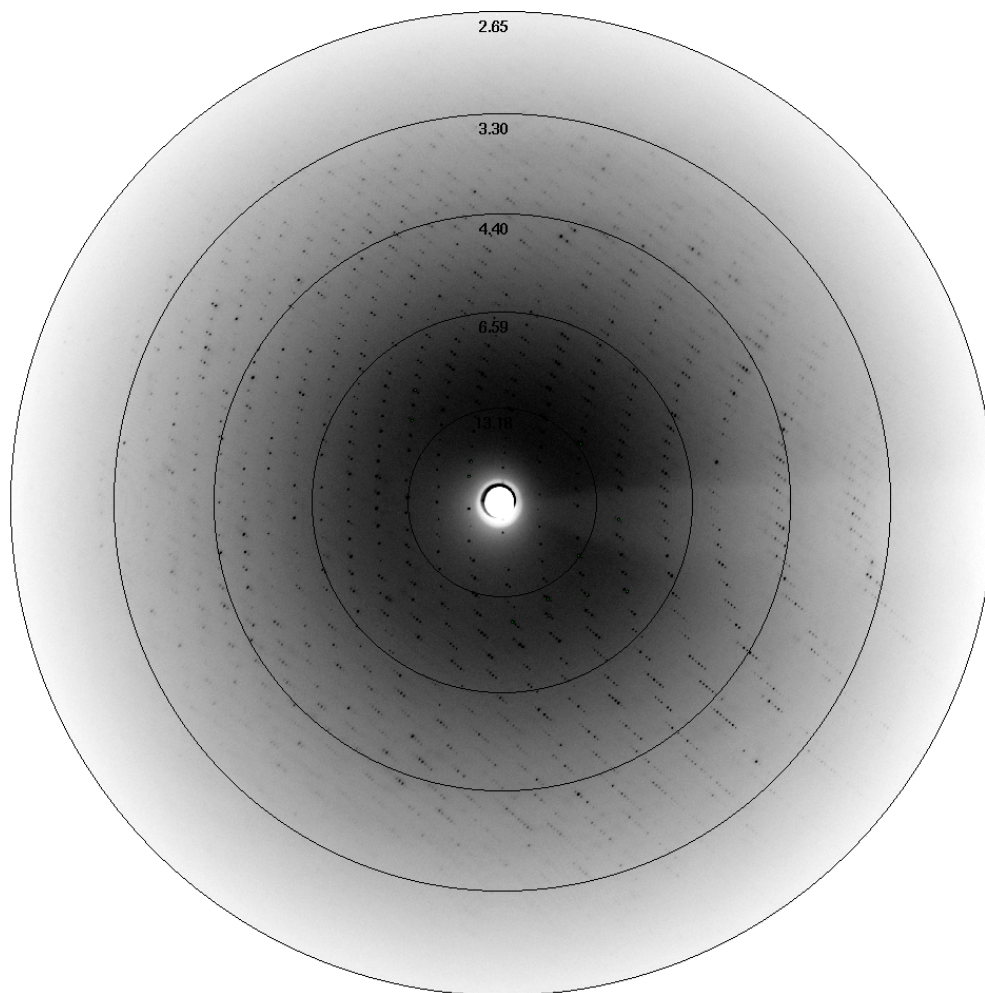


Abbildung 4.42: Beugungsaufnahme der primitiv tetragonalen Kristalle der D-AO-Tv. Die Daten wurden mit Synchrotronstrahlung ($\lambda = 0.8439 \text{ \AA}$) an der Multipol-Wiggler-*Beamline* BW7B (DORIS-Speicherring) an der EMBL-Außenstelle c/o DESY in Hamburg gemessen. Die Detektion erfolgte mit einer MAR345 Bildspeicherplatte. Messbedingungen: Temperatur: 100 K, Kristall-Detektor-Abstand: 520 mm, Drehung pro Aufnahme: 1° , Röntgendosis pro Aufnahme: 36 000 Units (*low bunch mode*), maximale Auflösung: 2.65 \AA , Kollimatordurchmesser: 0.3 mm.

mit wachsender Messdauer liegt. Dies verdeutlicht der hohe R_{sym} -Wert für die hochaufgelösten Reflexe, der auf die hohe Multiplizität bei schlechter Daten-

Tabelle 4.19: Charakteristische Daten des D-AO-Tv-Synchrotrondatensatzes. Der Datensatz wurde an der *Beamline* BW7B (Multipol-Wiggler), DORIS-Speicherring am DESY in Hamburg gemessen.

Wellenlänge [Å]	0.8439
Temperatur der Datensammlung [K]	100
Anzahl Observationen	361 300
Anzahl Observationen ($I/\sigma_I > 1$)	361 262
Anzahl unabhängiger Reflexe	41 225
Auflösungsbereich [Å]	25–2.75
Multiplizität	8.8
Multiplizität (erste Schale [Å])	7.9 (25–6.74)
Multiplizität (letzte Schale [Å])	9.4 (2.81–2.75)
Durchschnitt I/σ_I	18.5
Durchschnitt I/σ_I (erste Schale)	33.0
Durchschnitt I/σ_I (letzte Schale)	2.5
Vollständigkeit [%]	99.8
Vollständigkeit (erste Schale) [%]	96.9
Vollständigkeit (letzte Schale) [%]	100
R_{sym} [%]	9.7
R_{sym} (erste Schale) [%]	4.1
R_{sym} (letzte Schale) [%]	88.9

qualität zurückzuführen ist. Die Daten wurden bis 2.75 Å verwendet, da in diesem Auflösungsbereich I/σ_I noch bei 2.5 lag. Der Datensatz kann im gesamten Auflösungsbereich von 25–2.75 Å als vollständig angesehen werden.

Dieser Datensatz diente als Grundlage für alle weiteren Rechnungen.

4.2.6 Bestimmung der Raumgruppe

Eine exakte Bestimmung der Raumgruppe war allein durch die Skalierung der Daten nicht möglich, da die systematischen Auslöschungen der Reflexe keine

eindeutige Zuordnung zuließen. Es konnte lediglich das Vorhandensein von zwei Schraubenachsen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4.20).

Tabelle 4.20: Bestimmung der Raumgruppe: Spezielle Reflexbedingungen und systematische Auslöschungen des röntgendiffraktometrisch untersuchten Kristalls der D-AO-Tv. Die angegebenen I/σ_I -Werte sind Mittelwerte über alle beobachteten Reflexe, für welche die speziellen Reflektionsbedingungen 00l bzw. h00 gelten.

Schraubenachse	Reflektionsbedingung	mittlere Intensitäten
$P4_{\boxed{1/3}}2_12$	$00l = 4n$	$l \neq 4n: I/\sigma_I = 0.4$ $l = 4n: I/\sigma_I = 10.5$
$P4_{1/3}2_{\boxed{1}}2$	$h00 = 2n$	$h \neq 2n: I/\sigma_I = 0.8$ $h = 2n: I/\sigma_I = 8.5$

Eine Unterscheidung zwischen den Raumgruppen $P4_12_12$ und $P4_32_12$ war hier nicht möglich. Es konnte durch eine Analyse der PDB lediglich festgestellt – jedoch nicht begründet – werden, dass die Raumgruppe $P4_32_12$ bei Proteinröntgenstrukturen annähernd doppelt so häufig vorkommt wie $P4_12_12$ (Andersson and Hovmöller, 2000). Die exakte Symmetrie muss jedoch durch den Molekularen Ersatz bestimmt werden (siehe Abschnitt 4.2.9).

4.2.7 Test auf merohedrische Verzwilligung

Um den Verzwilligungsgrad des vermessenen Kristalls (siehe Abschnitt 4.2.5) zu bestimmen, wurde der Service des UCLA-DOE-Servers in Anspruch genommen (siehe A.2, Yeates (1997)). Der am Synchrotron vermessene Kristall war weder partiell noch perfekt verzwilligt.

4.2.8 Untersuchungen der Kristallpackung

Die Berechnung der Packungsdichte mit dem Programm MATTHEWS_COEF (CCP4, 1994) des vermessenen D-AO-Tv-Kristalls erfolgte mit den in Abschnitt 4.2.5 angegebenen Zellparametern, der Raumgruppe $P4_12_12$, einem Molekulargewicht von 40.1 kDa (Holoenzym) und einer Proteindichte von 1.22 mg/ml (Andersson and Hovmöller (2000), siehe Abschnitt 2.2.2.4). Es wurden zwei mögliche Lösungen berechnet (siehe Tabelle 4.21).

Tabelle 4.21: Mögliche Matthews-Koeffizienten des röntgendiffraktometrisch untersuchten Kristalls der D-AO-Tv (Matthews, 1968).

Anzahl Dimere in der asymmetrischen Einheit	1	2
$V_M [\frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}]$	4.78	2.39
Lösemittelanteil [%]	67.4	43.8

Da das Enzym im nativen Zustand als Dimer vorliegt (Müller, 2000), wurde angenommen, dass entweder ein oder zwei Dimere in der asymmetrischen Einheit des Kristalls vorliegen. Nach Matthews (1968) werden für Proteine mit einem Molekulargewicht um 40 kDa V_M -Werte zwischen 1.9 und $3.8 \frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}$ beobachtet. Der Lösemittelgehalt bewegt sich üblicherweise für die möglichen Raumgruppen zwischen 30 und 70 %. Es würden sich demnach zwei Dimere in der asymmetrischen Einheit der kristallographischen Zelle der D-AO-Tv befinden.

Für das Vorhandensein eines Dimers in der asymmetrischen Einheit spricht die mechanische Empfindlichkeit der Kristalle, die starke Verfärbung der Kristalle bei Zugabe von IZIT (Fa. Hampton Research) in die Mutterlauge (siehe Abbildung 4.41) sowie die schwache Streukraft der Kristalle.

Mit Hilfe einer Selbstrotationsrechnung sollte endgültig die Anzahl der Dimere in der asymmetrischen Einheit bestimmt werden (siehe Abschnitt 4.2.9.1).

4.2.9 Rechnungen zum Molekularen Ersatz

4.2.9.1 Selbstrotations- und native Pattersonfunktion

Abbildung 4.43 zeigt die graphische Darstellung der mit GLRF erstellten Selbstrotationsfunktion zur Suche nach zweizähligen nichtkristallographischen Achsen. Zur Festlegung eines günstigen Pattersonradius wurde in X-PLOR die Molekülausdehnung des verwendeten Strukturmodells (PDB-Kürzel: 1kif, Mattevi et al. (1996)) $69 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ ermittelt. Um eine möglichst gute Trennung zwischen den intra- und den intermolekularen Vektoren zu erreichen, wurde deshalb jeweils ein Pattersonradius von 35 \AA verwendet. Weitere wichtige Bedingungen waren:

überstrichene Polarwinkelbereiche	$0^\circ \leq \phi \leq 180^\circ, 0^\circ \leq \psi \leq 180^\circ$
Intervallgröße	$\Delta\phi = \Delta\psi = 3^\circ$
Auflösung	$20\text{--}4 \text{ \AA}$
Anzahl verwendeter Reflexe	die höchsten 2944 (13603 Reflexe im Auflösungsbereich)

Von besonderer Bedeutung war die Rechnung für $\kappa = 180^\circ$, wo die 422-Symmetrie bestätigt und die nichtkristallographischen Achsen lokalisiert werden konnte.

Jeder Peak in Abbildung 4.43 symbolisiert eine Drehachse. In der Mitte der Darstellung liegt die vierzählige kristallographische Achse und bei $\phi = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ usw. (jeweils $\psi = 90^\circ$) liegen die zweizähligen kristallographischen Achsen. Die schwächeren Peaks bei $\phi = 15^\circ, 30^\circ, 60^\circ, 75^\circ$ usw. (jeweils $\psi = 90^\circ$) sind nichtkristallographische Peaks. All diese Peaks lassen sich durch eine zweizählige Achse innerhalb eines Dimers erklären.

Eine Kreuzrotationsfunktion (siehe Abschnitt 4.2.9.3) mit einem dimeren Strukturmodell liefert zwei Peaks gleicher Höhe – sofern es sich um korrekte Lösungen handelt –, die um 180° gegeneinander gedreht sind, da das Modell immer zwei Orientierungen annehmen kann. Überführt man zwei solcher Lösungen ineinander (Programm ROTFUN, Brünger (1992b)), so müssen die Winkel der nichtkristallographischen Peaks in Abbildung 4.43 als Symmetrieeoperatoren auftreten. Es konnten alle oben aufgezählten Peaks wiedergefunden werden.

Dies bedeutet, dass ein Dimer in der asymmetrischen Einheit vorliegt; es sei denn,

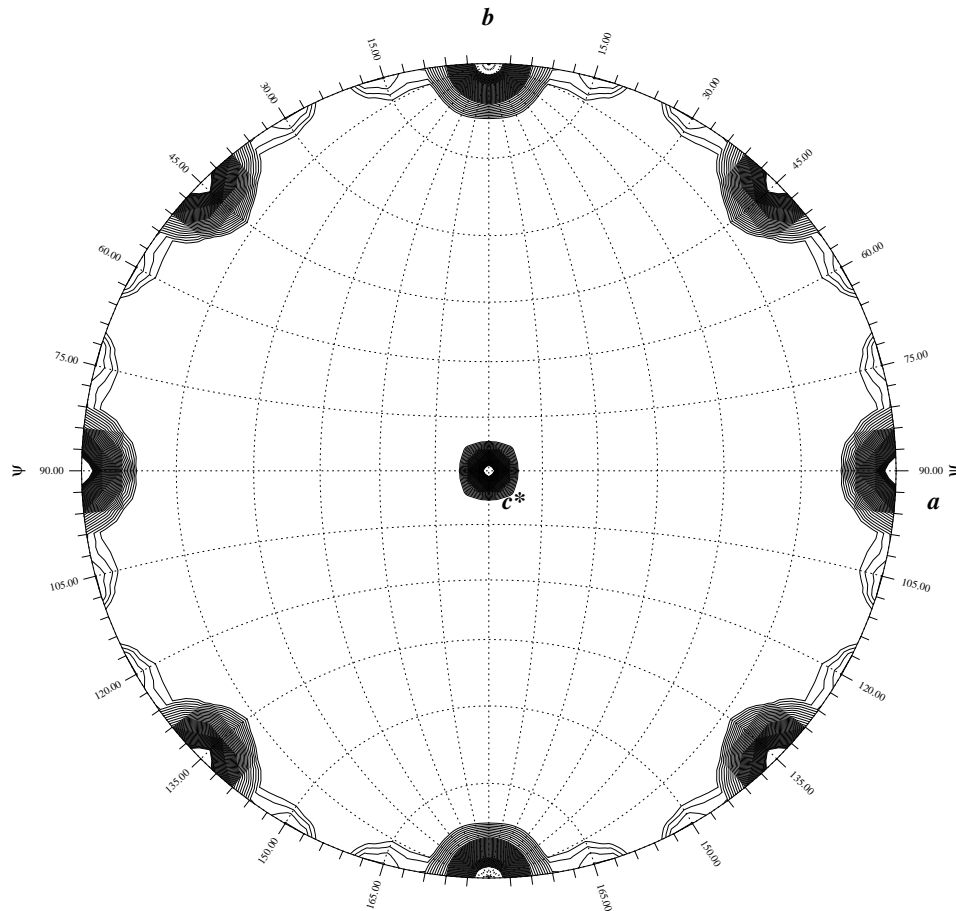


Abbildung 4.43: Stereographische Darstellung der Selbstrotationsfunktion für die D-AO-Tv im direkten Raum. Drehwinkel: $\kappa = 180^\circ$. Maximum: 1000. Mittelwert: 58.1. Standardabweichung: 65.6.

eine nichtkristallographische Achse liegt parallel zu einer kristallographischen Achse. Dann wäre diese nichtkristallographische Achse nicht in der Selbstrotationsfunktion zu sehen, da die schwachen nicht kristallographischen Peaks von den kristallographischen Peaks überdeckt würden.

Mit einer nativen Pattersonfunktion kann man auch solche nichtkristallographischen Symmetrien sichtbar machen. Dabei wird, neben dem Ursprungspike, mindestens ein weiterer Peak in der Pattersonkarte erwartet. In dem hier vorliegenden Fall konnte außer dem Ursprungspike kein weiterer Peak in der

Pattersonkarte beobachtet werden.

In der asymmetrischen Einheit des röntgendiffraktometrisch untersuchten D-AO-Tv-Kristalls liegt somit ein Dimer vor.

4.2.9.2 Suche nach der Modellsequenz

Die D-AO-Tv gehört der Gruppe der D-Aminosäureoxidasen an. Zu Beginn der Arbeit war die 3D-Struktur der D-AO aus Schweineniere bekannt (PDB-Kürzel: 1kif, Mattevi et al. (1996); PDB-Kürzel: 1an9, Mizutani et al. (1996)). Die durch eine FASTA-Recherche (Pearson and Lipman, 1988) ermittelte Sequenzidentität der D-AO-Tv mit diesem Enzym beträgt 26.9 %. In der PDB (Bernstein et al., 1977) ist bisher keine Proteinstruktur mit einer höheren Sequenzidentität abgelegt.

4.2.9.3 Kreuzrotations- und Translationsrechnungen

Zur Bestimmung der Kreuzrotations- und Translationsfunktion wurde CNS (Brünger et al., 1998) und EPMR (Kissinger et al., 1999) verwendet. Als Suchmodell diente die D-AO aus Schweineniere (PDB-Kürzel: 1kif). Dabei wurde in verschiedenen Ansätzen sowohl das Monomer als auch das Dimer als Poly-Ala-Strang (Gly wurden nicht ausgetauscht), als vollständiges Modell mit allen Seitenketten sowie als vollständiges Modell mit allen Seitenketten ohne die Bereiche mit starken Unterschieden in der Sequenz zwischen der Schweinenieren-D-AO und der D-AO-Tv verwendet.

Die Rechnungen mit CNS erfolgten in einer getrennten Rotations- und Translationssuche, wie auf Seite 61f beschrieben. Bei den Rechnungen mit einem monomeren Suchmodell wurde zunächst für das *erste* Monomer die Rotation und die Translation bestimmt und anschließend unter Vorgabe dieser Lösungen nach dem *zweiten* Monomer gesucht.

In der kombinierten Rotations- und Translationssuche mit EPMR (siehe Abschnitt 3.7.2) wurden ebenfalls die verschiedenen Varianten des Suchmodells eingesetzt. Die Rechnungen wurden jeweils mehrmals wiederholt, wobei die signifikanten Lösungen mehrfach auftreten sollten.

Einige der Lösungen wurden minimiert und MD-Simulationen unterzogen. Allerdings ergab keine der Lösungen eine interpretierbare Elektronendichte.

4.2.10 Strukturmodell der D-AO-Tv

Trotz der geringen Sequenzidentität von 26.9 % zwischen der D-AO-Tv und der D-AO aus Schweineniere kann von einer ähnlichen Faltung der beiden Proteine ausgegangen werden, da funktions- und strukturbestimmende Sequenz- und damit auch Strukturbereiche konserviert sind. So sind z.B. die Reste des aktiven Zentrums oder der Kosubstratbindungsstelle stark konserviert.

Um die Übereinstimmung zwischen dem Suchmodell und der zu lösenden Struktur der D-AO-Tv zu erhöhen, wurde auf der Basis der Struktur der D-AO aus Schweineniere (PDB-Kürzel: 1kif, Mattevi et al. (1996)) ein Strukturmodell für die D-AO-Tv berechnet. Die Sequenz der D-AO-Tv ist aus Klonierungsexperimenten bekannt (Daten nicht gezeigt).

Das Modell wurde mittels einer „halbautomatischen“ Strukturvorhersage erstellt. Dies bedeutet, dass keine manuelle Modellierung von nichtkonservierten Loopregionen durchgeführt wurde. Insertionen und Deletionen von Resten wurden automatisch mit dem Programm MODELLER in das Modell eingebaut und energieminiert. Das Sequenzalignment der beiden Proteine wurde manuell erstellt und korrigiert.

Zunächst wurde unter Verwendung von CLUSTALW ein multiples Sequenzalignment mit sechs verschiedenen D-AO-Sequenzen berechnet (siehe Tabelle 4.22), um zufällige Übereinstimmungen in den Sequenzen wirkungsvoller eliminieren und konservierte Bereiche besser identifizieren zu können.

Zur Erstellung eines strukturellen Sequenzalignments wurden basierend auf dem multiplen Sequenzalignment Insertionen und Deletionen manuell überprüft. Danach sollten sich keine Insertionen und Deletionen mehr im inneren des Proteins oder in Sekundärstrukturelementen befinden und nah beieinander liegende Insertionen und Deletionen sollten vereinigt sein. Abbildung 4.44 zeigt das mit JOY erstellte strukturelle Sequenzalignment der D-AO-Tv mit der D-AO aus Schweineniere.

Tabelle 4.22: D-AO-Sequenzen zur Berechnung eines multiplen Sequenzalignments. Die angegebenen Sequenzidentitäten mit der D-AO-Tv stammen aus Alignements mit dem FASTA-Algorithmus.

Organismus	Sequenzidentität
D-AO aus Schweineniere (Ronchi et al., 1982)	26.9 %
D-AO aus <i>Fussarium Solani</i> (Isogai et al., 1990)	39.5 %
D-AO aus <i>Rhodotorula Gracilis</i> (Alonso et al., 1998)	30.8 %
D-Asp Oxidase aus Rinderniere (Negri et al., 1992)	29.7 %
D-AO aus menschlicher Niere (Momoi et al., 1988)	28.3 %

Alle Insertionen bzw. Deletionen im strukturellen Sequenzalignment befinden sich in solvenszugänglichen Regionen bzw. in Loopregionen, so dass die globale Faltung des Proteins erhalten bleibt. Dieses Alignment diente als Eingabeinformation für die Erzeugung des Homologie-Modells mit MODELLER.

Zur Verbesserung der Qualität des Strukturmodells der D-AO-Tv wurde anschließend eine Energieminimierung mit dem Programm AMBER durchgeführt. Die geometrischen Eigenschaften des Modells wurden mit PROCHECK überprüft. Die Verteilung der Torsionswinkel der Hauptkette sind im Ramachandran-Plot dargestellt (siehe Abbildung 4.45).

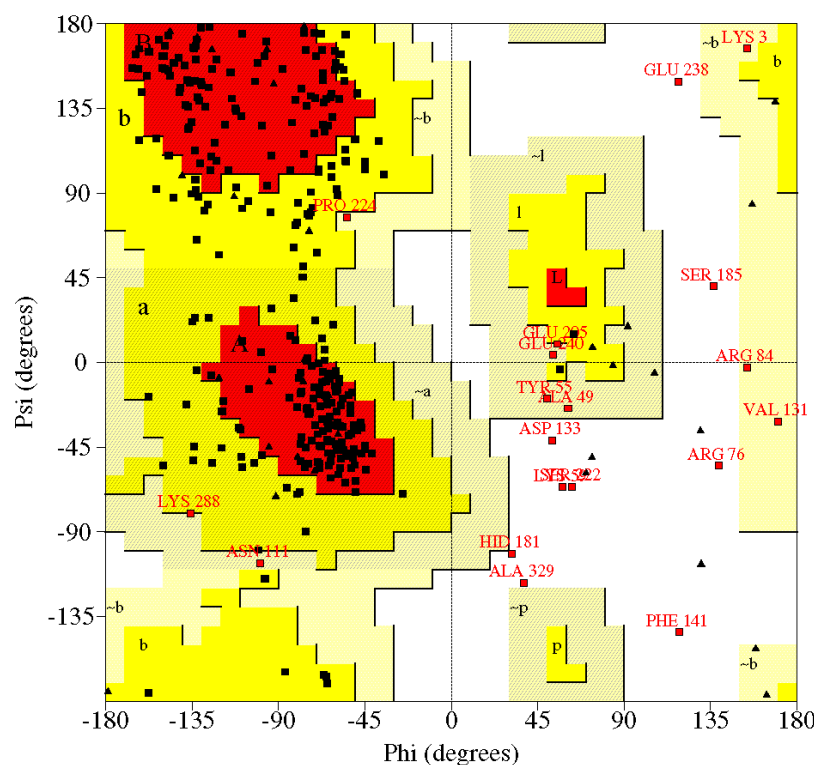


Abbildung 4.45: Ramachandran-Diagramm des energieminierten Strukturmodells der D-AO-Tv erzeugt mit PROCHECK. A, B, L: günstige Regionen, a, b, l, p: erweitert erlaubte Regionen, ~a, ~b, ~l, ~p: generell erlaubte Regionen, Glycine sind als Dreiecke dargestellt.

Die Reste mit verbotenen Torsionswinkeln sind in erster Linie durch den Austausch von Gly und Pro gegen andere Aminosäuren zustande gekommen.

Eine Überprüfung daraufhin, ob Teilbereiche des Modells energetisch ungünstig sind, erfolgte mit den Programmen VERIFY3D (siehe A.2, Luthy et al. (1992)) und ERRAT (siehe A.2, Colovos and Yeates (1993)). Als problematisch erwiesen sich solvenszugängliche Bereiche, sowohl in Loopregionen als auch in oberflächennahen β -Faltblättern. Die besonders problematischen Bereiche des Strukturmodells sind in Tabelle 4.23 aufgelistet.

Tabelle 4.23: Energetisch ungünstige Bereiche im Strukturmodell der D-AO-Tv, ermittelt mit den Programmen ERRAT und VERIFY3D.

Sequenzbereich	Sekundärstruktur
Glu 73–Arg 84	Loop
Leu 138–Cys 145	β -Faltblatt
Thr 165–Lys 168	β -Faltblatt
Arg 220–Leu 223	Insertion
Gly 290–Val 299	Insertion, β -Faltblatt

Die energetisch ungünstigen Bereiche im Modell liegen alle in oberflächennahen, d.h. solvenszugänglichen Bereichen. Es sollte daher nicht zu einer Veränderung der globalen Faltung des Proteins kommen, wenn diese Bereiche falsch gefaltet sind. Die D-AO-Tv und die D-AO aus Schweineniere haben offenbar einen gleichen, strukturell konservierten Kern.

Abbildung 4.46 zeigt das monomere Strukturmodell der D-AO-Tv.

Das Kosubstrat FAD aus der Struktur der Schweinenieren-D-AO konnte unverändert in das Modell der D-AO-Tv integriert werden. Diese Beobachtung wird durch die Sequenzen der Proteine bestätigt, da in beiden Sequenzen die stark konservierte Dinukleotid-Bindungsstelle vorhanden ist (Wierenga et al., 1983). Es sind lediglich einige Reste nicht korrekt orientiert, da das Modell ohne das Kosubstrat berechnet wurde und keine korrekt orientierten Wassermoleküle in das Modell eingebaut werden konnten.

Die für die Substratbindung essentiellen Reste Tyr 243 und Arg 302 (Mattevi et al., 1996) sind im Modell lokalisierbar und in der Nähe der postulierten Bindungs-

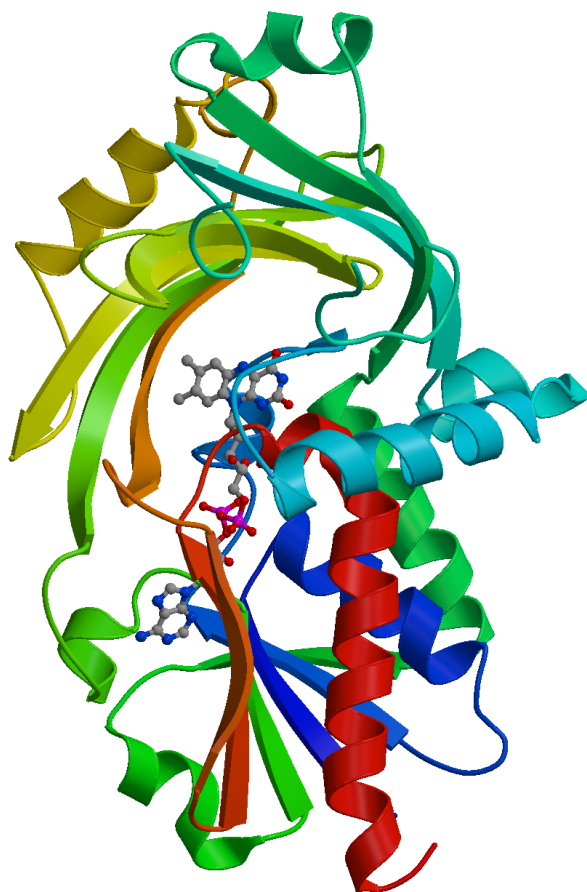


Abbildung 4.46: Strukturmodell des monomeren D-AO-Tv-Holoenzym. Das Modell wurde durch ein Homologiemodelling mit MODELLER berechnet. Das Kosubstrat wurde aus dem strukturalignierten Modell der D-AO aus Schweiniere übernommen. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT und RENDER erstellt.

stelle des Substrates.

Dennoch sollte das Modell als kritisch angesehen werden, da es auf einer Struktur mit geringer Sequenzhomologie (26.9 %) basiert, die zudem nur bis zu einer maximalen Auflösung von 2.6 Å verfeinert werden konnte. Das Strukturmodell der D-AO-Tv kann daher nur eine grobe Idee der Faltung des Proteins vermitteln und soll in erster Linie als verbessertes Suchmodell für die Strukturlösung mittels Molekularem Ersatz dienen.

4.2.11 Ausblick

Der Versuch, die Struktur der D-AO-Tv durch molekularen Ersatz zu lösen, erscheint mit dem verbesserten Suchmodell erfolgversprechend zu sein, da davon ausgegangen werden kann, dass auf Grund der strukturellen Homologien in markanten Bereichen mit der D-AO aus Schweineniere beide Proteine ähnlich gefaltet sind. Der vorhandene Datensatz sollte, trotz der geringen maximalen Auflösung von 2.75 Å, wegen der hohen Vollständigkeit und einem R_{sym} unter 10 % für eine Lösung der Struktur ausreichen (siehe Tabelle 4.19).

Falls mit den vorhandenen Daten eine Strukturlösung nicht möglich sein sollte, wären neue Kristallisationsansätze zur Lösung der Struktur durch isomorphen Ersatz oder MAD notwendig. Dabei wäre es wünschenswert, neue Kristallformen mit einer dichteren Packung zu finden, die weniger fragil sind und bessere Streueigenschaften aufweisen. Außerdem ist ein phosphathaltiges Fällungsmittel nur bedingt für die Suche nach Schwermetallderivaten geeignet (siehe Tabelle 4.18).

Selbst wenn sich mittels molekularem Ersatz ein Modell der Struktur finden ließe, wäre im weiteren Verlauf ein Datensatz mit höherer Auflösung wünschenswert. Möglicherweise ist dieser mit Synchrotronstrahlung aus frischen primitiv tetragonalen Kristallen zu gewinnen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden röntgenkristallographische Untersuchungen an zwei biotechnologisch relevanten Enzymen beschrieben, die Daten analysiert und interpretiert.

Die **R-Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*** ist ein homotetrameres NADP-abhängiges Enzym (Molmasse: 4×26.7 kDa) mit strenger 222-Punktsymmetrie aus der Gruppe der *short chain* Dehydrogenasen.

Das Enzym konnte bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Durch ESI-MS konnte die posttranslationale Abspaltung des N-terminalen Met nachgewiesen werden und mittels Dynamischer Lichtstreuung die homotetramere Quartärstruktur des Enzyms in Lösung bestätigt werden. Aus den CD-Spektren wurde ein recht hoher α -helicaler und ein niedriger β -Faltblatt-Anteil ermittelt, der größenordnungsmäßig durch die Kristallstruktur (α -Helix: 43 %, β -Faltblatt: 14 %) bestätigt werden konnte.

Mit Kristallen der zentriert orthorhombischen Raumgruppe I222 ($a = 56.5$ Å, $b = 84.4$ Å, $c = 115.3$ Å) ließen sich mit Cu K_α -Strahlung bei 4°C Röntgenreflexe bis zu einer maximalen Auflösung von 1.79 Å messen. Der Datensatz ließ sich auf einen R_{sym} -Wert von 6.2 % skalieren. Die gemessenen Intensitäten wurden für Rotations- und Translationsrechnungen im Pattersonraum nach der Methode des Molekularen Ersatzes eingesetzt. Als Suchmodell diente ein auf Poly-Alanin reduziertes Strukturmodell der $3\alpha,20\beta$ -HSD (PDB-Kürzel: 2hsd) mit einer Sequenzidentität von 39 %.

Aus den Rotations- und Translationsrechnungen konnten die Position und die Orientierung der R-ADH-Lb-Moleküle des Kristallverbandes eindeutig bestimmt werden. Die asymmetrischen Einheiten der Kristalle enthalten ein Monomer und zeigen eine hohe Packungsdichte mit einem Lösemittelanteil von 47 %.

An die Pattersonsuche schlossen sich Verfeinerungsrechnungen an, die zu kristallographischen R-Werten von 15.0 % für den R_{work} und 19.1 % für den R_{free} führten. Die $2F_oF_c$ -Elektronendichtekarten gaben deutliche Abweichungen zur

Elektronendichte des Anfangsmodells zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine Glättung der diffusen Solvensanteile und der Einbau von lokalisierten Wassermolekülen wirkungsvoll zur Verbesserung der Phasen ausnutzen ließen.

Ebenfalls mit Kristallen der zentriert orthorhombischen Raumgruppe I222 ließ sich mit Synchrotronstrahlung bei 100 K ein Datensatz bis 0.99 Å messen ($a = 56.0$ Å, $b = 80.1$ Å, $c = 114.6$ Å) und auf einen R_{sym} -Wert von 5.7 % skalieren. Als Grundlage zur Verfeinerung dieser Daten diente die bis 1.79 Å verfeinerte Struktur der R-ADH-Lb. Die Verfeinerung wurde parallel mit den Programmpaketen CNS, CCP4 und SHELX unter Einbeziehung anisotroper Temperaturfaktoren, multipler Konformationen, Wasserstoffatomen und der Glättung diffuser Solvensanteile durchgeführt. Nach der Endverfeinerung enthält das Modell abhängig vom verwendeten Verfeinerungsprogramm bis zu 389 Wassermoleküle pro Monomer. Die kristallographischen R-Werte des endverfeinerten Modells betrugen 13.4 % für den R_{work} und 15.3 % für den R_{free} . Die Verfeinerungsergebnisse sind unter Berücksichtigung der individuellen Charakteristika der drei Programmpakete vergleichbar.

Das abschließende Modell enthält ein halbes Mg^{2+} -Ion, ein Molekül des Kosubstrats NADP sowie ein Acetophenonmolekül pro Monomer. In der Dissertation wird die parallele α/β -Eindomänenstruktur der R-ADH-Lb ausführlich analysiert und mit anderen SDR-Proteinen verglichen.

Die **D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis*** ist ein homodimeres FAD-abhängiges Enzym (Molmasse: 2×39.2 kDa).

Das Enzym konnte bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Mittels dynamischen Lichtstreuexperimenten wurde eine mittlere Verteilung von Aggregaten aus zwei Dimeren in Lösung nachgewiesen. Die aus CD-Spektren ermittelten Sekundärstrukturanteile zeigen gute Übereinstimmung mit den aus dem Strukturmodell bestimmten Sekundärstrukturanteilen von 28 % bzw. 21 % für die α -helikalen und β -Faltblatt-Anteile.

Mit primitiv tetragonalen Kristallen (Raumgruppe $P4_12_12$ oder $P4_32_12$, $a = b = 97.9$ Å, $c = 318.8$ Å) konnte mit Synchrotronstrahlung ein vollständiger Röntgendatensatz bis zu einer maximalen Auflösung von 2.75 Å gemessen

werden. Die Skalierung ergab einen R_{sym} -Wert von 9.7 %. Die Daten wurden zur Berechnung von Selbstrotations- und Pattersonfunktionen zur Festlegung nichtkristallographischer Symmetrieelemente verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der asymmetrischen Einheit der kristallographischen Einheitszelle ein Homodimer befindet, was einer geringen Packungsdichte mit einem Lösemittelanteil von 67 % entspricht.

Für die Strukturlösung nach der Methode des Molekularen Ersatzes wurde auf der Basis der 3D-Struktur der D-AO aus der Schweineniere (PDB-Kürzel: 1kif) ein Homologiemodell berechnet. Ein Abschluss der Strukturlösung und damit die exakte Bestimmung der Raumgruppe steht noch aus.

A Anhang

A.1 Standardeingabedateien

A.1.1 Verfeinerung mit CCP4

```
#!/bin/csh -f
#
#goto peakmax
#goto mappage
#goto fft1
#goto fft2
#goto refmac
#goto protin
goto hgen
#####
#
hgen:
#
set resolution = '20 0.99'
#
# cp ../o/a.pdb a1.pdb
# cp radh_merge16_aniso_minimierung.pdb a1099.pdb
# cp a1.pdb a1.pdb
#
set nummer = 0
schleife:
@ nummer = $nummer + 1
#
#
# Generate hudrogens and calculate contribution of them.
#####
nice -20 hgen \
XYZIN a1099.pdb \
XYZOUT a1_hydr099.pdb \
<< eof
HYDR0gens SEPARate ! Hydrogens in seperate file
```

```

eof
#
#
#      Calculate contribution from hydrogens. NOSCALE option should
#      be used to preserve absolute scale of structure factors of
#      hydrogens
#####
sfall:
nice -20 sfall \
HKLIN  /users/jmu/radh180899/daten/radh_merge2_097_free.mtz \
HKLOUT radh_merge2_097_free_hydr099.mtz \
XYZIN  a1_hydr099.pdb \
  << eof
NOSCALE
MODE SFCALC XYZIN HKLIN
LABI FP=F_NAT SIGFP=SIGF_NAT FREE=FreeR_flag
LABO FC=FC_hyd PHIC=PHIC_hyd
!Refinement parameters
RESO ${resolution}
BINS 20
END
eof
#
#      Run protin to generate list of restraints
#####
#
protin:
nice -20 protin \
DICTPROTN  /users/jmu/radh180899/ccp4/protin.dic \
PROTOUT    /tmp/radh_prt099.tmp \
PROTCOUNTS /tmp/radh_cnt099.tmp \
XYZIN      a1099.pdb \
  << end-protin
SYMMETRY 23
CHNNAM ID A CHNTYP 1
CHNTYP 1 NTERM 1 SER 3 CTERM 251 GLN 2 MULP 1 260 MULP 1 270

CHNNAM ID W CHNTYP 2
CHNTYP 2 WAT

```

```
#SPHERicity 5.0      ! Restraints on sphericity of atoms.
                     ! Default is 2.0 but is not good.
```

```

!Scaling parameters
SCAL TYPE BULK LSSC ANISO ! Aniso scaling to remove overall
                           ! crystallographic mode. Gaussian bulk

! solvent correction.
NCYC 1
FREE 0
MONI MEDI
BINS 20

! Dies sind die stereochemischen Parameter aus "$CDOC/refmac.doc"

DISTANCE 1.0 0.02 0.04 0.05 0.05 0.02
PLANE 1.0 0.03 0.02
CHIRAL 1.0 0.15
TEMP 1.0 2.0 3.0 2.0 3.0
TORSION 1.0 15.0 3.0 15.0 20.0
VANDerwaal 1.0 1.0 -0.3,0.0

END
end-refmac
#
#####
#
mv radh_ref_a099.pdb a1099.pdb
cp a1099.pdb radh_merge21_aniso_minimierung.pdb
mv radh_out099.mtz radh_out099.mtz_save
/bin/rm /tmp/*.tmp
if ($nummer < 10) then
    goto schleife
endif
#goto ENDE
#
#####
#
/bin/rm radh_merge2_097_free_hydr099.mtz
/bin/rm *099.tmp
#
#####
#

```



```

#exit
#
#  Sigmaa style 2mfo-dfc map with restored data
#
/bin/rm *099.xyz_e
#
fft1:
nice -20 fftbig \
#/usr/bin/nice -20 fftbig \
hklin radh_out099.mtz_save \
mapout /tmp/2fofc099.xyz      \
<<eof
title radh Sigmaa style 2mfo-Dfc map calculated with refmac coefficients
labi F1=2F0FCWT PHI=PH2F0FCWT
grid SAMPLE 3
reso ${resolution}
end
eof
#
#
nice -20 mapmask mapin /tmp/2fofc099.xyz  mapout 2fofc099.xyz_e << eof
#/usr/bin/nice -20 mapmask mapin 2fofc.xyz  mapout 2fofc.xyz_e << eof
XYZLIM -70 80 -40 100 -30 90
AXIS X,Y,Z
SYMMETRY 23
eof
#
#####
#
#  Sigmaa style mfo-dfc map with restored data
#
fft2:
nice -20 fftbig \
#/usr/bin/nice -20 fftbig \
hklin radh_out099.mtz_save \
mapout /tmp/fofc099.xyz      \
<<eof
title radh Sigmaa style mfo-Dfc map calculated with refmac coefficients
labi F1=F0FCWT PHI=PHF0FCWT

```

```
grid SAMPLE 3
reso  ${resolution}
end
eof
#
#
nice -20 mapmask mapin /tmp/fofc099.xyz  mapout fofc099.xyz_e << eof
#/usr/bin/nice -20 mapmask mapin fofc.xyz  mapout fofc.xyz_e << eof
XYZLIM -70 80 -40 100 -30 90
AXIS X,Y,Z
SYMMETRY 23
eof
#
#####
/bin/rm /tmp/*fofc099.xyz
#####
#
#exit
#
peakmax:
#
#
nice -20 peakmax \
mapin  fofc099.xyz_e \
xyzout peaks099.pdb \
<< eof
numpeaks 300
THRESHOLD RMS 4
eof
#
watpeak:
#
/bin/rm water099.pdb
#
nice -20 watpeak \
xyzin a1099.pdb \
peaks peaks099.pdb \
xyzout water099.pdb \
<<eof
```

```

title Possible waters from rADH-Lb with NADP
distance 2.5 3.6
CHAIN W
HETATOMONLY
BFACTOR 20 1.0
symm 23
eof
#
#####
#
/bin/rm peaks099.pdb
#
#####
#
exit

```

A.1.2 Verfeinerung mit SHELX-97

```

TITL R-ADH-Lb
CELL 0.84390 55.992 80.106 114.591 90.00 90.00 90.00
ZERR      8 0.056 0.080 0.115 0.00 0.00 0.00

REM Space group I222

LATT -2 ! Space group
SYMM -X, -Y, Z ! Symmetry operations
SYMM -X, Y, -Z
SYMM X, -Y, -Z
SFAC C H N O S P MG2+ ! Scattering factor types and
UNIT 9612 22408 2608 6452 64 24 36 ! unit-cell contents

DEFS 0.04 0.2 0.02 0.10 ! Global default restraint esds
CGLS 15 -20 ! 15 Conjugate gradient cycles, every 20th
! reflection used
BLOC 1 -1 N_1 > 0_85 ! definition of parts of the structure to
! refine: xyz
BLOC 2 -2 N_80 > 0_170 ! Uij are refined
BLOC 3 -3 N_165 > 0_251
BLOC 4 -4 0_301 > LAST
BLOC 5 ! xyz, but no Uij are refined

```

```

DAMP
SHEL 30 0.99
FMAP 2                ! Difference Fourier
PLAN 200 -2.5         ! Peaksearch and identification of
                      ! potential waters
LIST 6                ! Output phased reflection file to
                      ! generate maps etc.
WPDB 2                ! Write PDB output file

DELU $C_* $N_* $O_* $S_* ! Rigid bond restraints - ignored for isotropic
DELU 0.01 P5A_260 > CM_270
SIMU 0.1 $C_* $N_* $O_* $S_* $P_* ! Similar U restraints -
                                ! isotropic or anis.

SIMU 0.04 P5A_260 > CM_270
ISOR 0.1 0_301 > LAST    ! Approximate isotropic restraints for waters;
CONN 0 0_301 > LAST      ! Don't include water in connectivity
                      ! array and
BUMP                    ! generate antibumping restraints automatically
REM HOPE                ! Anisotropic scaling not included
ANIS_* N CA CB CD CD1 CD2 CG CG1 CG2 CE CE1 CE2 CE3 CH2 CZ CZ2 CZ3 NH1 =
      NH2 ND1 ND2 NE1 NE2 NZ OG OH C O MG2+_252 MG2+_256 $S
                      ! Make atoms anisotropic
TEMP -173                ! Sets the temperature T of data collection
                      ! in degrees celsius

REM Remove MERG 4 instruction if Friedel opposites should not be merged

MERG 4

REM MORE 0 would reduce output if not required for diagnostic purposes
REM 2 or 3 for more output for diagnostic purposes

MORE 1

REM Peptide standard torsion angles and restraints
REM Remove 'REM ' before RTAB to activate remaining tables

RTAB_* Cvol CA
RTAB_* Omeg CA_+ N_+ C CA

```

```

RTAB_* Phi C_- N CA C
RTAB_* Psi N CA C N_+
RTAB_ARG Chi1 N CA CB CG
RTAB_ARG Chi2 CA CB CG CD
RTAB_ARG Chi3 CB CG CD NE
RTAB_ARG Chi4 CG CD NE CZ

```

```

.
.
.

```

```

WGHT      0.100000
SWAT      1.120018      6.6606
FVAR      0.06988      0.50000      0.00000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000      0.50000
FVAR      0.50000      0.50000

```

REM Coordinates of the amino acids an heteroatoms

```

RESI      1      SER
N          3      0.011567      0.418509      0.024168      11.00000      0.35651 =
                0.44655      0.49357      0.10581      0.19549      0.04424
AFIX      33
HOA        2      0.008559      0.407849      0.026537      11.00000      -1.50000
HOB        2      0.027611      0.420025      0.023477      11.00000      -1.50000
HOC        2      0.004462      0.420341      0.017131      11.00000      -1.50000
AFIX        0
CA          1      0.002031      0.430266      0.032785      11.00000      0.33406 =
                0.32172      0.65490      -0.01783      0.14644      -0.08005
AFIX      13
HA          2      0.009486      0.428685      0.040649      11.00000      -1.20000
AFIX        0
CB          1      0.008602      0.446966      0.027451      11.00000      0.45869 =
                0.42706      0.62554      0.12457      0.09746      -0.01665
AFIX      23

```

```

HB1  2    0.004448    0.456357    0.032711    11.00000    -1.20000
HB2  2    0.025812    0.447521    0.025510    11.00000    -1.20000
AFIX  0
OG   4   -0.006153    0.446994    0.016950    11.00000    0.55707 =
          0.60530    0.84831    0.15715    -0.10621    -0.21365
AFIX 83
HG   2   -0.020611    0.446297    0.018845    11.00000    -1.50000
AFIX  0
C    1   -0.024777    0.425699    0.032828    11.00000    0.28373 =
          0.38358    0.39996   -0.02926    0.04603    0.04597
O    4   -0.031765    0.419099    0.023561    11.00000    0.67106 =
          0.51680    0.31987    0.07651    0.03349   -0.27681
.
.
.

HKLF 4

```

A.1.3 Eingabedatei für SANDER

```

#file: 1dao_min.in
#Plain minimization, all residues free
&cntrl
  IREST = 0,      #Kennzeichen zum Neustart des Laufs (hier:
                  #kein Effekt)
  IMIN  = 1,      #Kennzeichen Minimierung (hier: Minimierung,
                  #keine MD)
  NTX   = 1,      #Formatzuweisung fuer 'restrt' (hier: formatiert)
  MAXCYC = 2000,  #max. Anzahl an Minimierungszyklen
  NCYC  = 200,    #nach 200 Zyklen Wechsel der Minimierungsmethode
  NTMIN = 1,      #Minimierungsmethode (s. NCYC)
  NTB   = 0,      #periodische Grenzschrift (hier: keine)
  DX0   = 0.0002, #initiale Schrittlänge
  DXM   = 1.0,    #max. erlaubte Schrittlänge
  DELE  = 0.0001,
  DRMS  = 0.005,  #Konvergenzkriterium [kcal/mol Å]
  NRUN  = 0,      #Anzahl der MD-Läufe (hier: keine)
  NSNB  = 25,     #nach 25 Schritten Update der Liste
                  #ungebundener Paare

```

```
CUT      = 9.00,    #Cutoff-Distanz fuer nicht bindende Interaktionen
SCEE     = 1.2,     #1-4 elektrostatische Interaktionen geteilt
                    #durch 1.2
IDIEL    = 1,       #konstante Dielektrizitätsfunktion
NTPR     = 100,     #alle 100 Schritte Ausgabe der Energieinformationen
&end
```

A.2 Verwendete Internetseiten

BOBSCRIPT:

http://orval.rega.kuleuven.ac.be/~robert/BobScript/bob_doc_2_4.html

BOXSHADE:

http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

Axel T. Brünger (CNS, X-PLOR):

<http://xplor.csb.yale.edu/>

BRENDA:

<http://www.brenda.uni-koeln.de/>

CCP4:

<http://www.dl.ac.uk/CCP/CCP4/>

Course on protein structure and comparative modelling:

<http://129.195.254.61/swissmod/course/course-index.htm>

Dynamische Lichtstreuung:

<http://www.protein-solutions.com/>

EBI (FASTA, BLAST, CLUSTALW):

<http://www2.ebi.ac.uk/>

ExPASy Molecular Biology Server:

<http://www.expasy.ch/>

Gnuplot:

http://www.cs.dartmouth.edu/gnuplot_info.html

Heavy Atom Database:

<http://www.bmm.icnet.uk/had/heavyatom.html>

Hetero-compound Information Centre - Uppsala (HIC-Up):

<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>

JOY:

<http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~joy/>

Proteinkristallographie:

<http://www.crystallography.net/>

<http://www.rose.brandeis.edu/PRLab/Crystalizations/cool/>

<http://www-structure.llnl.gov/>

Leo (Wörterbuch Englisch/Deutsch):

<http://dict.leo.org/>

MOLSCRIPT:

<http://www.avatar.se/molscript/>

MAPS (Multiple Alignment of Protein Structures):

<http://bioinfo1.mbfys.lu.se/TOP/maps.html>

O:

<http://xray.bmc.uu.se/alwyn/>

PARVATI (Protein Anisotropic Refinement Validation and Analysis Tool):

<http://www.bmsc.washington.edu/parvati/>

PC44 (Egon) (zur Erstellung der Arbeit verwendeter LINUX-PC):

<http://pc44.bc.uni-koeln.de/>

PDB:

<http://www.rcsb.org/pdb/>

Pedro's BioMolecular Research Tools:

http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/bionet/research_tools.html

The Principles of Protein Structure:

<http://www.med.unibs.it/~marchesi/pps97/>

<http://129.195.254.61/swissmod/course/course-index.htm>

Protein-Protein Interaction Server:

<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/>

RASTER3D:

<http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/raster3d.html>

Relibase (Suche in Protein-Ligand Datenbanken):

<http://relibase.ebi.ac.uk/>

REPLACE Homepage:

<http://como.bio.columbia.edu/~tong/Public/Replace/replace.html>

RPMfind:

<http://rpmfind.net/linux/RPM/>

SCOP (Structural Classification of Proteins):

<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>

SHELX:

<http://shelx.uni-ac.gwdg.de/SHELX/index.html>

SYSTERS Cluster Set (Protein Datenbank):

<http://www.dkfz-heidelberg.de/tbi/services/cluster/systersform>

UCLA-DOE-*Server* (ERRAT, VERIFY3D, *Twinning*):

<http://www.doe-mpi.ucla.edu/Services/>

Uppsala Software Factory:

<http://xray.bmc.uu.se/usf/>

XFig Version 3.2.3b User Manual:

<http://www-epb.lbl.gov/BVSmith/xfig/>

XLAT (Verfeinerung von Zellkonstanten):

<http://www-structure.llnl.gov/weblat/weblat.htm>

Abbildungsverzeichnis

1.1	Reaktionsschema der Alkoholdehydrogenasen	5
1.2	Aminosäuresequenz der R-ADH-Lb	7
1.3	Reaktionsschema der D-Aminosäureoxidasen	9
1.4	Aminosäuresequenz der D-AO-Tv	11
2.1	Phasendiagramm bei der Kristallisation	21
2.2	Kristallisationsmethoden (Dampfdiffusion)	22
4.1	SDS-PAGE der R-ADH-Lb	68
4.2	MALDI-MS der R-ADH-Lb	69
4.3	ESI-MS der R-ADH-Lb	70
4.4	CD-Spektrum der R-ADH-Lb	72
4.5	Schmelzkurve der R-ADH-Lb	74
4.6	Orthorhombischer Kristall der R-ADH-Lb	78
4.7	Beugungsaufnahme der I zentriert orthorhombischen Kristalle der R-ADH-Lb	79
4.8	Hochaufgelöste Beugungsaufnahme der I zentriert orthorhombi- schen Kristalle der R-ADH-Lb	82
4.9	Niedrigaufgelöste Beugungsaufnahme der I zentriert orthorhom- bischen Kristalle der R-ADH-Lb	83
4.10	Sequenzalignment von R-ADH-Lb und 2HSD mit FASTA (PDB).	86
4.11	RMS-Abweichungen der drei R-ADH-Lb-Strukturen	99
4.12	$2F_oF_c$ -Elektronendichten der Reste His186 und Phe242	102
4.13	Ramachandran-Diagramm der 3D-Struktur der R-ADH-Lb	103
4.14	Luzzati-Diagramm der hochaufgelösten 3D-Struktur der R-ADH-Lb	105
4.15	Mittlere isotrope Temperaturfaktoren und mittlere Anisotropie der Hauptkette der 3D-Struktur der R-ADH-Lb	106
4.16	Monomer der R-ADH-Lb nach den Temperaturfaktoren angefärbt	107
4.17	Monomer der R-ADH-Lb in Ellipsoiddarstellung	108
4.18	Ellipsoiddarstellung einzelner mobiler Aminosäuren	110
4.19	Monomer der R-ADH-Lb	111

4.20	Schematische Darstellung der Faltungstopologie des R-ADH-Lb-Monomers	112
4.21	Homotetramer der R-ADH-Lb	114
4.22	Kontaktstelle an der P-Achse im R-ADH-Lb-Tetramer	116
4.23	Kontaktstelle an der Q-Achse im R-ADH-Lb-Tetramer	117
4.24	Kontaktstelle an der R-Achse im R-ADH-Lb-Tetramer	119
4.25	$2F_oF_c$ -Elektronendichte multipler Konformationen der R-ADH-Lb	121
4.26	$2F_oF_c$ -Elektronendichte der flexiblen Oberflächenschleife	122
4.27	F_oF_c -Elektronendichten des katalytischen Zentrums	124
4.28	Superposition der NAD(P)-Bindungsregionen bekannter SDR-Strukturen	125
4.29	Adenin-Ribose-Bindestelle des NADP an die R-ADH-Lb	126
4.30	Bindestelle des Pyrophosphatteils des NADP an die R-ADH-Lb	127
4.31	Nicotinamid-Ribose-Bindestelle des NADP an die R-ADH-Lb	128
4.32	Oberfläche des aktiven Zentrums der R-ADH-Lb	130
4.33	Aktives Zentrum der R-ADH-Lb	131
4.34	Multiples Sequenzalignment bekannter SDR-Strukturen	136
4.35	Superposition bekannter SDR-Strukturen	137
4.36	SDS-PAGE der D-AO-Tv	140
4.37	MALDI-MS der D-AO-Tv	141
4.38	CD-Spektrum der D-AO-Tv	143
4.39	Schmelzkurve der D-AO-Tv	145
4.40	Primitiv tetragonale Kristalle der D-AO-Tv (I)	147
4.41	Primitiv tetragonale Kristalle der D-AO-Tv (II)	148
4.42	Beugungsaufnahme der primitiv tetragonalen Kristalle der D-AO-Tv	150
4.43	Selbstrotationsfunktion für die D-AO-Tv im direkten Raum	155
4.44	Strukturrichtiges Sequenzalignment der D-AO-Tv mit der D-AO aus Schweineniere	159
4.45	Ramachandran-Diagramm des Strukturmodells der D-AO-Tv	160
4.46	Strukturmodell der D-AO-Tv	162

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Geräte	40
3.2	Sonstige Materialien	41
3.3	EDV-Systeme	42
4.1	Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuexperimente mit der R-ADH-Lb	71
4.2	Mittels CD-Spektroskopie ermittelte Sekundärstrukturelemente der R-ADH-Lb	73
4.3	Erfolgreiche Kristallisationsansätze der R-ADH-Lb	76
4.4	Charakteristische Daten der R-ADH-Lb-Datensätze	81
4.5	Übersicht über die wichtigsten Stufen der Verfeinerung des R-ADH-Lb-Apoenzym-Strukturmodells	89
4.6	Strukturverfeinerung des hochaufgelösten Datensatzes mit CCP4	92
4.7	Strukturverfeinerung des hochaufgelösten Datensatzes mit CNS	94
4.8	Strukturverfeinerung des hochaufgelösten Datensatzes mit SHELX-97	96
4.9	Charakteristische Daten der endverfeinerten 3D-Struktur der R-ADH-Lb	98
4.10	Charakteristische stereochemische Größen der endverfeinerten 3D-Struktur der R-ADH-Lb	101
4.11	Statistik der Φ/Ψ -Torsionswinkelverteilung (Ramachandran-Diagramm)	104
4.12	Sekundärstrukturelemente der R-ADH-Lb	113
4.13	Reste mit multiplen Konformationen in der 3D-Struktur der R-ADH-Lb	120
4.14	Reste, die die Kosubstratspezifität der SDR-Proteine beeinflussen (Postulat)	129
4.15	Primär- und Tertiärstrukturhomologie bekannter SDR-Proteinstrukturen	135

4.16 Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuexperimente mit der D-AO-Tv	142
4.17 Mittels CD-Spektroskopie ermittelte Sekundärstrukturelemente der D-AO-Tv	144
4.18 Optimierte Kristallisationsansätze der D-AO-Tv	147
4.19 Charakteristische Daten des D-AO-Tv-Synchrotondatensatzes . . .	151
4.20 Bestimmung der Raumgruppe: Spezielle Reflexbedingungen des röntgendiffraktometrisch untersuchten Kristalls der D-AO-Tv . . .	152
4.21 Mögliche Matthews-Koeffizienten des röntgendiffraktometrisch untersuchten Kristalls der D-AO-Tv	153
4.22 D-AO-Sequenzen zur Berechnung eines multiplen Sequenz-alignments	158
4.23 Energetisch ungünstige Bereiche im Strukturmodell der D-AO-Tv .	161

Literaturverzeichnis

- Adams, M. J., Ford, G. C., Koekoek, R., Lentz, P. J., , Rossmann, M. G., Smiley, I. E., Schevitz, R. W., and Wonacott, A. J. (1970). Structure of lactate dehydrogenase at 2-8 Å resolution. *Nature*, 227(263):1098–103.
- Alonso, J., Barredo, J. L., Diez, B., Mellado, E., Salto, F., Garcia, J. L., and Cortes, E. (1998). D-amino-acid oxidase gene from *rhodotorula gracilis* (*rhodosporidium toruloides*) atcc 26217. *Microbiology*, 144 (Pt 4):1095–101.
- Andersson, A., Jordan, D., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1996). Crystal structure of the ternary complex of 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase from *magnaporthe grisea* with nadph and an active-site inhibitor. *Structure*, 4(10):1161–70.
- Andersson, K. M. and Hovmöller, S. (2000). The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Cryst*, D56:789–90.
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J., and Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from uv circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*, 6(4):383–90.
- Audic, S., Lopez, F., Claverie, J. M., Poirot, O., and Abergel, C. (1997). Samba: an interactive software for optimizing the design of biological macromolecules crystallization experiments. *Proteins*, 29(2):252–7.
- Beck, K., Gambee, J. E., Bohan, C. A., and Bachinger, H. P. (1996). The c-terminal domain of cartilage matrix protein assembles into a triple-stranded alpha-helical coiled-coil structure. *J Mol Biol*, 256(5):909–23.
- Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., and Ladenstein, R. (1999). The catalytic reaction and inhibition mechanism of *drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound nad-ketone adduct at 1.4 Å resolution by x-ray crystallography. *J Mol Biol*, 289(2):335–55.

- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., , Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977). The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol*, 112(3):535–42.
- Böhm, H.-J., Klebe, G., and Kubinyi, H. (1996). Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Blundell, T. L. and Johnson, L. N. (1976). Protein crystallography. *Academic Press*, New York, London, San Francisco:331.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J. (1996). Protein methods. *Wiley-Liss Inc*.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M., Stingl, K., Kotterhan, M., Huthmacher, K., and Drauz, K. H. (1995). Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6:2851–88.
- Borras, T., Persson, B., and Jörnvall, H. (1989). Eye lens zeta-crystallin relationships to the family of long-chainalcohol/polyol dehydrogenases. protein trimming and conservation of stable parts. *Biochemistry*, 28(15):6133–9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–54.
- Brückner, H. and Hansch, M. (1989). Gas chromatographic detection of d-amino acids as common constituents of fermented foods. *Chromatographia*, 28:487–92.
- Breton, R., Housset, D., Mazza, C., and Fontecilla-Camps, J. C. (1996). The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and nadp+ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure*, 4(8):905–15.
- Brändén, C.-I. and Jones, T. A. (1990). Between objectivity and subjectivity. *Nature*, 343:687–98.

- Brünger, A. T. (1987). Crystallographic r-factor refinement by molecular dynamics. *Science*, 225:458–60.
- Brünger, A. T. (1992a). Free r value: A novel statistical quality assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–5.
- Brünger, A. T. (1992b). *X-PLOR. Version 3.1. A system for X-Ray crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven, USA.
- Brünger, A. T. (1997). Free r value: Cross-validation in crystallography. *Meth Enzymol*, 277:366–96.
- Brodelius, P., Hagerdal, B., and Mosbach, K. (1981). Production of α -keto acids with alginate-entrapped whole cells of yeast *trigonopsis variabilis*. *Adv in Biotechnol*, 3:373–6.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998). Crystallography & nmr system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54 (Pt 5):905–21.
- Carrea, G. and Riva, S. (1984). Applications of cofactor dependent enzymes in organic synthesis. *Chimica Oggi*, 3:17–21.
- Carter, C. W. J. and Carter, C. W. (1978). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J Biol Chem*, 254:12219–23.
- Carugo, O. and Bordo, D. (1999). How many water molecules can be detected by protein crystallography? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55 (Pt 2):479–83.
- CCP4 (1994). The ccp4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50 (Pt 5):760–63.
- Chandra, N., Acharya, K. R., and Moody, P. C. (1999). Analysis and characterization of data from twinned crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55 (Pt 10):1750–8.

- Chavira, R., Burnett, T. J., and Hageman, J. H. (1984). Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem*, 136(2):446–50.
- Clark, D. P. (1989). The fermentation pathways of escherichia coli. *FEMS Microbiol Rev*, 5(3):223–34.
- Colovos, C. and Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*, 2(9):1511–9.
- Conway, T., Sewell, G. W., Osman, Y. A., and Ingram, L. O. (1987). Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase ii gene from zymomonas mobilis. *J Bacteriol*, 169(6):2591–7.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., and McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Cryst*, D50:414–23.
- Dauter, Z., Wilson, K. S., Sieker, L. C., Meyer, J., and Moulis, J. M. (1997). Atomic resolution (0.94 Å) structure of clostridium acidurici ferredoxin. detailed geometry of [4Fe-4S] clusters in a protein. *Biochemistry*, 36(51):16065–73.
- Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H., and Jones, K. M., editors (1969). *Data for Biomedical Research*. Oxford University Press, 2 edition.
- Deacon, A. M., Weeks, C. M., Miller, R., and Ealick, S. E. (1998). The shake-and-bake structure determination of triclinic lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16):9284–9.
- Deléage, G. and Roux, B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng*, 1(4):289–94.
- Diederichs, K. and Karplus, P. A. (1997). Improved r-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography [published erratum appears in nat struct biol 1997 jul;4(7):592]. *Nat Struct Biol*, 4(4):269–75.
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E., Soderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Soderberg, B. O., Tapia, O., Brändén, C. I., and Akeson, A. (1976). Three-

- dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2-4 Å resolution. *J Mol Biol*, 102(1):27–59.
- Engh, R. A. and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement. *Acta Cryst*, A47:392–400.
- Enzyme-Nomenclature (1979). Academic Press, New York.
- Faber, K. (1997). *Biotransformation in organic chemistry: A textbook*. Springer Verlag, Berlin, 3rd edition.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71.
- Fischer, L. (1998). D-amino acid oxidases in biotechnology. *Recent Res Devel in Microbiol*, 2:295–317.
- Fischer, L., Gabler, M., Horner, R., and Wagner, F. (1996). Microbial d-amino acid oxidases (ec 4.3.3). *Ann N Y Acad Sci*, 799:683–8.
- French, G. S. and Wilson, K. S. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst*, A34:517.
- Frishman, D. and Argos, P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng*, 9(2):133–42.
- Fukui, K., Watanabe, F., Shibata, T., and Miyake, Y. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of cdnas encoding porcine kidney d-amino acid oxidase. *Biochemistry*, 26(12):3612–8.
- Ganzhorn, A. J., Green, D. W., Hershey, A. D., Gould, R. M., and Plapp, B. V. (1987). Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. amino acid residue 294 and substrate specificity. *J Biol Chem*, 262(8):3754–61.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol*, 120(1):97–120.

- Gavazzi, E., Malgaretti, N., and Curti, B. (1987). Immunochemical properties of d-amino-acid oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 915(2):188–98.
- Gemeiner, P., Stefuca, V., Welwardova, A., Michalkova, E., Welward, L., Kurill-ova, L., and Danielsson, B. (1993). Direct determination of the cephalosporin transforming activity of immobilized cells with use of an enzyme thermistor. 1. verification of the mathematical model [published erratum appears in enzyme microb technol 1993 may;15(5):446]. *Enzyme Microb Technol*, 15(1):50–6.
- Ghosh, D., Wawrzak, Z., Weeks, C. M., Duax, W. L., and Erman, M. (1994). The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta- hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure*, 2(7):629–40.
- Ghosh, D., Weeks, C. M., Grochulski, P., Duax, W. L., Erman, M., Rimsay, R. L., and Orr, J. C. (1991). Three-dimensional structure of holo 3 alpha,20 beta- hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(22):10064–8.
- Gibrat, J. F., Garnier, J., and Robson, B. (1987). Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. new parameters and consideration of residue pairs. *J Mol Biol*, 198(3):425–43.
- Gonzalez, F. J., Montes, J., Martin, F., Lopez, M. C., Ferminan, E., Catalan, J., Galan, M. A., and Dominguez, A. (1997). Molecular cloning of tvdao1, a gene encoding a d-amino acid oxidase from *trigonopsis variabilis* and its expression in *saccharomyces cerevisiae* and *kluveromyces lactis*. *Yeast*, 13(15):1399–8.
- Greenfield, N. J. (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem*, 235(1):1–10.
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997). Swiss-model and the swiss-pdbviewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15):2714–23.
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (2000). Principles of protein structure, comparative protein modelling and visualisation. *Course on Protein structure and Modelling*, SWISS-MODEL, Interactive Tools.

- Hamilton, G. A., Buckthal, D. J., Mortensen, R. M., and Zerby, K. W. (1979). Reactions of cysteamine and other amine metabolites with glyoxylate and oxygen catalyzed by mammalian d-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(6):2625–9.
- Hendricksen, W. A. and Konnert, J. H. (1980a). Incorporating of stereochemical information into crystallographic refinement. *Computing in crystallography*, Hrsg.: R. Diamond, S. Ramaseshan, K. Venkatesan, Indian Academy of Sciences, Banlore:13.01–13.25.
- Hendricksen, W. A. and Konnert, J. H. (1980b). Stereochemically restrained crystallographic least-square refinement of macromolecular structures. *Biomolecular structure, function, conformation and evolution*, Hrsg.: R. Srinivasan, Pergamon Press, Oxford:43–57.
- Hikkanen, A. and Decker, K. (1985). D-amino acids. *Methods of enzymatic analysis*, 8, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim:329–40.
- Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G., and Blanquet, S. (1989). Extent of n-terminal methionine excision from escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(21):8247–51.
- Housset, D., Benabicha, F., Pichon-Pesme, V., Jelsch, C., Maierhofer, A., David, S., Fontecilla-Camps, J. C., and Lecomte, C. (2000). Towards the charge-density study of proteins: a room-temperature scorpion-toxin structure at 0.96 Å resolution as a first test case [in process citation]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56 (Pt 2):151–60.
- Hughes, M. N. and Poole, R. K. (1989). *Metals and micro-organisms*. Chapman and Hall, London.
- Hülsmeier, M., Hecht, H. J., Niefind, K., Hofer, B., Eltis, L. D., Timmis, K. N., and Schomburg, D. (1998). Crystal structure of cis-biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase from a pcb degrader at 2.0 Å resolution. *Protein Sci*, 7(6):1286–93.

- Hummel, W. (1997). New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 58:145–84.
- Hummel, W., Schütte, H., Schmid, E., Wandrey, C., and Kula, M. R. (1987). Isolation of l-phenylalanine dehydrogenase from rhodococcus sp. m4 and its application for production of l-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 26:433–39.
- Hummel, W., Weiss, N., and Kula, M. R. (1984). Isolation and charakterisation of a bacterium processing l-phenylalanine dehydrogenase activity. *Arch Microbiol*, 137:15–9.
- Inoue, T., Sunagawa, M., Mori, A., Imai, C., Fukuda, M., Takagi, M., and Yano, K. (1989). Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from acetobacter aceti. *J Bacteriol*, 171(6):3115–22.
- Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Ueda, Y., and Kohsaka, M. (1990). Structure and expression of cdna for d-amino acid oxidase active against cephalosporin c from fusarium solani. *J Biochem (Tokyo)*, 108(6):1063–9.
- Jancarik, J. and Kim, S. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst*, 24:409–11.
- Janssen, D. B., Keuning, S., and Witholt, B. (1987). Involvement of a quinoprotein alcohol dehydrogenase and a nad-dependent aldehyd dehydrogenase in 2-chlorethanol metabolism in xenobacter autrophicus cj10. *J Gen Microbiol*, 133:85–92.
- Jeffrey, J., editor (1980). *Dehydrogenases. Requiring nicotinamide coenzymes*. Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart, 1 edition.
- Johnson, W. C. J. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, 7(3):205–14.
- Jones, S. and Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1):13–20.

- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr*, A47:110–19.
- Jörnvall, H., Persson, B., and Jeffery, J. (1987). Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem*, 167(2):195–201.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (sdr). *Biochemistry*, 34(18):6003–13.
- Jörnvall, H., Persson, M., and Jeffery, J. (1981). Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7):4226–30.
- Kabsch, W. and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12):2577–637.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 60(20):2299–301.
- Kera, Y., Niino, A., Ikeda, T., Okada, H., and Yamada, R. (1998). Peroxisomal localization of d-aspartate oxidase and development of peroxisomes in the yeast *Cryptococcus humicola* uj1 grown on d-aspartate. *Biochim Biophys Acta*, 1379(3):399–405.
- Kissinger, C. R., Gehlhaar, D. K., and Fogel, D. B. (1999). Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55 (Pt 2):484–91.
- Kleywegt, G. J. (2000). Validation of protein crystal structures [in process citation]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56 (Pt 3):249–65.
- Kleywegt, G. J. and Brünger, A. T. (1996). Checking your imagination: applications of the free r value. *Structure*, 4(8):897–904.

- Kleywegt, J. and Jones, T. A. (1997). Good model-building and refinement practice. *Meth Enzymol*, 277:208–30.
- Konno, R. and Yasumura, Y. (1992). D-amino-acid oxidase and its physiological function. *Int J Biochem*, 24(4):519–24.
- Kraulis, P. J. (1997). Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst*, 24:946–50.
- Krebs, F. C. (2000). How the r factor changes as molecules become larger. *J Appl Cryst*, 33(2):392–93.
- Krebs, H. A. (1935). Metabolism of amino acids. iii: Deamination of amino acids. *Biochem J*, 29:1620–44.
- Krook, M., Marekov, L., and Jörnvall, H. (1990). Purification and structural characterization of placental nad(+)-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. the primary structure reveals the enzyme to belong to the short-chain alcohol dehydrogenase family. *Biochemistry*, 29(3):738–43.
- Kula, M.-R. (1999). Enzymtechnologie: uralte katalysatoren – neue möglichkeiten. *Bioforum*, 9/99:521–4.
- Lamport, L. (1985). Latex - a document preparation system. *Addison Wesley Co., Inc., Reading MA, USA*.
- Lamzin, V. S. and Wilson, K. S. (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Cryst*, D49:129–47.
- Lange-Savage, G., Berchtold, H., Liesum, A., Budt, K. H., Peyman, A., Knolle, J., Sedlacek, J., Fabry, M., and Hilgenfeld, R. (1997). Structure of hoe/bay 793 complexed to human immunodeficiency virus (hiv- 1) protease in two different crystal forms–structure/function relationship and influence of crystal packing [published erratum appears in eur j biochem 1997 nov 1;249(3):912]. *Eur J Biochem*, 248(2):313–22.

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, 26:283–91.
- Lehmann, W. D. (1996). *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1. Auflage.
- Levin, J. M., Robson, B., and Garnier, J. (1986). An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett*, 205(2):303–8.
- Longhi, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A., and Cambillau, C. (1997). Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of fusarium solani cutinase: stereochemical analysis. *J Mol Biol*, 268(4):779–99.
- Luthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364):83–5.
- Luzzati, P. V. (1952). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Acta Cryst*, 5:802–10.
- Massa, W. (1996). *Kristallstrukturbestimmung*. B. G. Teubner, Stuttgart, 2. Auflage.
- Mattevi, A., Vanoni, M. A., and Curti, B. (1997). Structure of d-amino acid oxidase: new insights from an old enzyme. *Curr Opin Struct Biol*, 7(6):804–10.
- Mattevi, A., Vanoni, M. A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M., and Curti, B. (1996). Crystal structure of d-amino acid oxidase: a case of active site mirror- image convergent evolution with flavocytochrome b2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(15):7496–501.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 33(2):491–7.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem*, 189(1):1–23.
- McRee, D. E. (1996). Practical protein crystallography. *Academic Press*, San Diego:101.

- Meister, A. (1965). Biochemistry of the amino acids. *Academic Press*, New York, 2nd edn, Vol.1,:220–4, 297–304.
- Merritt, E. A. and Murphy, M. E. P. (1994). Raster3d version 2.0. a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50 (Pt 6):869–73.
- Mizuguchi, K., Deane, C. M., Blundell, T. L., Johnson, M. S., and Overington, J. P. (1998). Joy: protein sequence-structure representation and analysis. *Bioinformatics*, 14(7):617–23.
- Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C., and Miura, R. (1996). Three-dimensional structure of porcine kidney d-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. *J Biochem (Tokyo)*, 120(1):14–7.
- Müller, M. K. (2000). *D-Aminosäureoxidase aus Trigonopsis variabilis DSM 70714: Isolierung, Charakterisierung und biotechnologische Anwendung*. PhD thesis, TU Braunschweig.
- Momoi, K., Fukui, K., Watanabe, F., and Miyake, Y. (1988). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human kidney d- amino acid oxidase. *FEBS Lett*, 238(1):180–4.
- Moore, C. H., Taylor, S. S., Smith, M. J., and Hartley, B. S. (1978). *Atlas of Protein Sequence and Structure*, (Dayhoff, M. O., Ed.), Vol. 5, Suppl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC:68.
- Moreno, C. M. (1986). Theoretical approaches to d-amino acid oxidase. *J Theor Biol*, 119(3):369–78.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., and Chothia, C. (1995). Scop: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, 247(4):536–40.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., and Yamada, Y. (1998). Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9):4876–81.

- Nakajima, N. D., Conrad, D., Sumi, H., Suzuki, K., Esaki, N., Wandrey, C., and Soda, K. (1990). Continuous conversion of optically pure l-methionine from d-enantiomer contaminated preparations by an immobilized enzyme membrane reactor. *J Ferment Technol*, 70:322–55.
- Negri, A., Cecilian, F., Tedeschi, G., Simon, T., and Ronchi, S. (1992). The primary structure of the flavoprotein d-aspartate oxidase from beef kidney. *J Biol Chem*, 267(17):11865–71.
- Niefind, K., Riebel, B., Müller, J., Hummel, W., and Schomburg, D. (2000). Crystallization and preliminary characterization of crystals of r- alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 12):1696–1698.
- Olsiewski, P. J., Kaczorowski, G. J., and Walsh, C. (1980). Purification and properties of d-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, 255(10):4487–94.
- Oppenheimer, N. J. and Handlon, A. J. (1992). *Mechanism of NAD-Dependent Enzymes*, volume XX (Mechanisms of catalysis) of *The Enzymes*. Academic Press, New York, 3 edition.
- Orengo, C. A., Jones, D. T., and Thornton, J. M. (1994). Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature*, 372(6507):631–4.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth Enzymol*, 276:407–26.
- Pearlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., III, T. E. C., DeBolt, T. E., Ferguson, D. M., Seibel, G. L., and Kollman, P. A. (1995). Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp Phys Commun*, 91:1–41.
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(8):2444–8.

- Peltoketo, H., Isomaa, V., Maentausta, O., and Vihko, R. (1988). Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett*, 239(1):73–7.
- Persson, B., , and Jörnvall, H. (1994). A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (mdr). sub- lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, vat-1 and other proteins. *Eur J Biochem*, 226(1):15–22.
- Persson, B., Krook, M., and Jörnvall, H. (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur J Biochem*, 200(2):537–43.
- Pilone, S. M., Buto, S., and Pollegioni, L. (1995). A process of bioconversion of cephalosporin c by *rhodotorula gracilis* d-amino acid oxidase. *Biotechnol Let*, 17:199–204.
- Provencher, S. W. and Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20(1):33–7.
- Ramachandran, G. N. and Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem*, 23:283–438.
- Read, R. J. (1986). Improved fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Cryst*, A42:140–9.
- Read, R. J. (1990). Structure-factor probabilities for related structures. *Acta Cryst*, A46:900–12.
- Reid, M. F. and Fewson, C. A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol*, 20(1):13–56.
- Riebel, B. (1996). *Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuer mikrobieller NAD(P)-abhängiger Alkoholdehydrogenasen*. PhD thesis, Universität Düsseldorf.
- Robson, B. and Garnier, J. (1988). Introduction to proteins and protein engineering. *Elsevier*, London:195–224.

- Ronchi, S., Minchiotti, L., Galliano, M., Curti, B., Swenson, R. P., , and Massey, V. (1982). The primary structure of d-amino acid oxidase from pig kidney. ii. isolation and sequence of overlap peptides and the complete sequence. *J Biol Chem*, 257(15):8824–34.
- Rossmann, M. G. and Blow, D. M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst*, 15:24–31.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C.-I., and Banaszak, L. J. (1975). Evolutionary and structural relationship among dehydrogenases. In *The Enzymes*, pages 61–102. Academic Press, New York.
- Russell, R. B. and Barton, G. J. (1992). Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins*, 14(2):309–23.
- Sali, A. and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 234(3):779–815.
- Santos, N. C. and Castanho, M. A. (1996). Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus [published erratum appears in *biophys j* 1997 mar;72(3):1481]. *Biophys J*, 71(3):1641–50.
- Schomburg, D. and Reichelt, J. (1988). Bragi: A comprehensive protein modeling program system. *J Mol Graphics*, 6:161–165.
- Schröder, M. (1997). Untersuchungen zur automatisierten ermittlung idealer kristallisationsbedingungen von proteinen. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Schulz, G. E. and Schirmer, R. H. (1990). Principles of protein structure. *Springer-Verlag*, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Schwartz, M. F. and Jörnvall, H. (1976). Structural analyses of mutant and wild-type alcohol dehydrogenases from drosophila melanogaster. *Eur J Biochem*, 68(1):159–68.
- Sheldrick, G. M. (1990). Phase annealing in shelx-90: direct methods for larger structures. *Acta Cryst*, A46:467–73.

- Sheldrick, G. M. and Schneider, T. R. (1997). Shelxl: high resolution refinement. *Meth Enzymol*, 277:319–43.
- Sippl, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, 17(4):355–62.
- Smith, G. D., Blessing, R. H., Ealick, S. E., Fontecilla-Camps, J. C., Hauptman, H. A., Housset, D., Langs, D. A., and Miller, R. (1997). Ab initio structure determination and refinement of a scorpion protein toxin. *Acta Cryst*, D53:551–57.
- Smith, T. F. and Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 147(1):195–7.
- Snyder, S. H. and Kim, P. M. (2000). D-amino acids as putative neurotransmitters: focus on d-serine [in process citation]. *Neurochem Res*, 25(5):553–60.
- Sreerama, N. and Woody, R. W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem*, 209(1):32–44.
- Stec, S., Zhou, R., and Teeter, M. M. (1995). Full-matrix refinement of the protein crambin at 0.83 Å and 130 k. *Acta Cryst*, D51:663–81.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., and Mitsui, Y. (1996a). Crystal structure of the ternary complex of mouse lung carbonyl reductase at 1.8 Å resolution: the structural origin of coenzyme specificity in the short-chain dehydrogenase/reductase family. *Structure*, 4(1):33–45.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., and Mitsui, Y. (1996b). Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 α-hydroxysteroid dehydrogenase from escherichia coli. *Biochemistry*, 35(24):7715–30.
- Tedeschi, G., Negri, A., Bernardini, G., Oungre, E., Ceciliani, F., and Ronchi, S. (1999). D-aspartate oxidase is present in ovaries, eggs and embryos but not in testis of xenopus laevis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 124(4):489–94.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22):4673–80.
- Tong, L. and Rossmann, M. (1997). Rotation function calculations with glrf program. *Meth Enzymol*, 276:594–611.
- Vaguine, A. A., Richelle, J., and Wodak, S. J. (1999). Sfcheck: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55 (Pt 1):191–205.
- Validation-Network (1998). Who checks the checkers? four validation tools applied to eight atomic resolution structures. eu 3-d validation network. *J Mol Biol*, 276(2):417–36.
- Van den Munckhof, R. J. (1996). In situ heterogeneity of peroxisomal oxidase activities: an update. *Histochem J*, 28(6):401–29.
- Venkatachalam, C. M. (1968). Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. v. conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers*, 6(10):1425–36.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1992). *Biochemie*. VCH, Weinheim.
- Wells, J. A. (1987). Protein engineering of subtilisin. in: Protein engineering dale. L. Oxender and C. F. Fox (ed), Alan R. Liss Inc. NY, 25:279–87.
- Wierenga, R. K., Drenth, J., and Schulz, G. E. (1983). Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the fad-binding domain of p-hydroxybenzoate hydroxylase with the fad- as well as nadph-binding domains of glutathione reductase. *J Mol Biol*, 167(3):725–39.
- Williams, T. and Kelley, C. (1996). Gnuplot: An interactive plotting program. *The Manual*, Version 3.6a.

Wilson, A. J. C. (1942). Determination of absolute from relative x-ray intensity data. *Nature*, 150:152ff.

Yeates, T. O. (1997). Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol*, 276:344–58.

Vorabveröffentlichungen

- Niefind, K., Riebel, B., Müller, J., Hummel, W. and Schomburg, D. (2000). Crystallization and Preliminary Characterization of Crystals of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta. Cryst.* **D56/12**, 1696.
- Müller, J., Niefind, K., Riebel, B., Hummel, W. and Schomburg, D. (1999). Crystal Structure of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* at 1.8 Å resolution: A NADP-dependent R-specific short chain alcohol dehydrogenase, suitable as a new industrial biocatalyst. 5th European Workshop on Crystallography of Biological Macromolecules, Como.
- Gabler, M., Müller, J., Schomburg, D. und Fischer, L. (1998). Aufreinigung, Charakterisierung und Kristallisation der D-Aminosäureoxidase aus dem Pilz *Fusarium oxysporum*. DECHEMA-Jahrestagung, Wiesbaden.

Lebenslauf

23. April 1968	geboren in Erfurt, Staatsangehörigkeit deutsch
1974–1984	Polytechnische Oberschule in Erfurt
April–Juni 1984	Gesamtschule in Aßlar
August 1984–1988	Gymnasium Köln Niehl
Juni 1988	Abitur
Juli 1988–Februar 1990	Zivildienst
April 1990	Beginn des Chemiestudiums an der Universität zu Köln
April 1993	Vordiplomprüfung
Oktober 1995	Diplomprüfung
November 1995– August 1996	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. H. W. Klein an der Universität zu Köln Thema: „Kinetische Untersuchungen an der löslichen Insulinrezeptorkinasedomäne anhand ausgewählter Phosphorylierungsdomänen“
seit Januar 1997	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. D. Schomburg an der Universität zu Köln